Genexpression im menschlichen Hoden und im humanen hepatozellulären Karzinom

Arthur Gerl

Diss. München
1994

FREE
LIBRARY
OF
THE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0013

Aus der Medizinischen Klinik II des Klinikums Großhadern
der Ludwig Maximilians-Universität zu München
Direktor: Prof. Dr. G. Paumgartner

Genexpression im menschlichen Hoden und im humanen hepatozellulären Karzinom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Arthur Gerl
aus
Ruhpolding
1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. K. Mann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Paumgartner
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Genexpression in eukaryonten Zellen	1
1.1.1.	Transskription	1
1.1.2.	Translation	2
1.1.3.	Post-translationale Proteinmodifikationen	5
1.2.	Genexpression im menschlichen Hoden und im humanen hepatozellulären Karzinom: Ausgangspunkt und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	6
2.	METHODEN	8
2.1.	Isolierung von mRNS	8
2.1.1.	Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden	8
2.1.1.1.	Geräte	8
2.1.1.2.	Chemikalien	8
2.1.1.3.	Lösungen	9
2.1.1.4.	Gewebe	12
2.1.1.5.	Isolierungsschritte	12
2.1.1.5.1.	Isolierung der Mikrosomenfraktion	13
2.1.1.5.2.	Phenolextraktion	14
2.1.1.5.3.	Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS	15
2.1.1.5.4.	Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose	15
2.1.2.	Isolierung von mRNS aus menschlichem Hepatom	18
2.1.2.1.	Geräte	18
2.1.2.2.	Chemikalien	18
2.1.2.3.	Lösungen	18
2.1.2.4.	Gewebe	18

		Seite
2.1.2.5.	Isolierungsschritte	20
2.1.2.5.1.	Isolierung der Mikrosomenfraktion	20
2.1.2.5.2.	Isolierung des postmitochondrialen Überstandes	21
2.1.2.5.3.	Phenolextraktion	21
2.1.2.5.4.	Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS oder zytoplasmatischen Gesamt-RNS	21
2.1.2.5.5.	Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose	21
2.1.3.	Isolierung von mRNS aus Rattenherzen	22
2.1.3.1.	Geräte	22
2.1.3.2.	Chemikalien	22
2.1.3.3.	Lösungen	22
2.1.3.4.	Gewebe	24
2.1.3.5.	Isolierungsschritte	24
2.1.3.5.1.	Isolierung der Mikrosomenfraktion	24
2.1.3.5.2.	Phenolextraktion	25
2.1.3.5.3.	Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS	25
2.1.3.5.4.	Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose	25
2.1.4.	Isolierung von mRNS aus Rattenleber	26
2.1.4.1.	Geräte	26
2.1.4.2.	Chemikalien	26
2.1.4.3.	Lösungen	26
2.1.4.4.	Gewebe	27
2.1.4.5.	Isolierungsschritte	27
2.1.4.5.1.	Isolierung der Mikrosomenfraktion	27
2.1.4.5.2.	Phenolextraktion	28
2.1.4.5.3.	Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS	28
2.1.4.5.4.	Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose	28

		Seite
2.1.5.	Isolierung von mRNS aus menschlicher Plazenta	29
2.1.5.1.	Geräte	29
2.1.5.2.	Chemikalien	29
2.1.5.3.	Lösungen	29
2.1.5.4.	Gewebe	30
2.1.5.5.	Isolierungsschritte	30
2.1.5.5.1.	Isolierung des postmitochondrialen Überstandes	30
2.1.5.5.2.	Phenolextraktion	31
2.1.5.5.3.	Waschen der zytoplasmatischen Gesamt-RNS	31
2.1.5.5.4.	Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose	31
2.2.	In-vitro Translation von mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System	32
2.2.1.	Chemikalien	32
2.2.2.	Lösungen	32
2.2.3.	Vorgehen	33
2.2.3.1.	Inkubation von mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System	33
2.2.3.2.	Messung der ^{35}S Methionin Inkorporation in das Gesamtprotein	34
2.3.	Elektrophorese und Fluorographie	36
2.3.1.	Geräte	36
2.3.2.	Chemikalien	36
2.3.3.	Lösungen	37
2.3.4.	Herstellung der SDS-Gele	40
2.3.5.	Probenbereitung	41
2.3.6.	Auftragen der Proben	41
2.3.7.	Elektrophorese	42
2.3.8.	Färben und Entfärben des Gels	42
2.3.9.	Fluorographie	43

		Seite
3.	ERGEBNISSE	46
3.1.	Isolierung von mRNS	46
3.1.1.	Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden	48
3.1.2.	Isolierung von mRNS aus menschlichem Hepatom	50
3.1.2.1.	Isolierung von mRNS aus der Mikrosomenfraktion menschlichen Hepatoms	50
3.1.2.2.	Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlichen Hepatoms	52
3.1.3.	Ergebnisse der Isolierung von mRNS aus den Referenzgeweben Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta	54
3.1.3.1.	Isolierung von mRNS aus Rattenherz	54
3.1.3.2.	Isolierung von mRNS aus Rattenleber	56
3.1.3.3.	Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlicher Plazenta	57
3.2.	Zellfreie Translation	58
3.3.	Elektrophorese und Fluorographie	60
4.	DISKUSSION	62
4.1.	Allgemeine Gesichtspunkte zur Isolierung von mRNS	62
4.2.	Spezielle Gesichtspunkte zur Isolierung von mRNS aus den verschiedenen Geweben	64
4.2.1.	Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden	64
4.2.2.	Isolierung von mRNS aus menschlichem Hepatom	66
4.2.3.	Isolierung von mRNS aus den Referenzgeweben Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta	71
4.3.	In-vitro Translation von mRNS in einem mRNS-abhängigen zellfreien System	73

		Seite
4.4.	Elektrophorese und Fluorographie	75
4.5.	Bedeutung und Anwendung der Ergebnisse	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	80
7.	ANHANG	94
8.	DANKSAGUNG	95
9.	LEBENSLAUF	96

1. EINLEITUNG

1.1. Genexpression in eukaryonten Zellen

Seit der Aufklärung der Ribonukleinsäurestruktur durch Watson und Crick 1953 (78) wurden in zahlreichen experimentellen Arbeiten die Mechanismen der Genexpression in eukaryonten Organismen untersucht.

Die wesentlichen Schritte der Genexpression in eukaryonten Zellen werden im Folgenden kurz dargelegt und erläutert.

1.1.1. Transskription

In eukaryonten Zellen ist die in Form von DNS gespeicherte genetische Information im Gegensatz zu Prokaryonten durch eine Kernmembran vom Zytosol getrennt, so daß Transskription und Translation ungekoppelt in zwei verschiedenen zellulären Kompartimenten ablaufen. Die DNS der Eukaryonten ist in einzelnen Transskriptionsabschnitten, den sogenannten Transcriptons (70) angeordnet, von denen jede Zelle bis zu $2x10^5$ enthält. Jedes Transcripton umfaßt eine oder mehrere codierende DNS-Sequenzen, die als Gene im eigentlichen Sinne zu benennen sind (70). Den einzelnen Genen sind DNS-Sequenzen ohne codierende Information zwischengeschaltet, aber auch die Gene selbst sind durch nicht-codierende DNS-Sequenzen, die sogenannten Introns (1,25), unterbrochen.

Mit Hilfe der DNS-abhängigen RNS-Polymerase werden die einzelnen Transcriptons in Heterogene nukleäre RNS (HnRNS), der Vorstufe von mRNS, transskribiert (1,13,16,21,62,70).

Diese HnRNS bleibt zum weit überwiegenden Teil im Zellkern und wird dort wieder abgebaut (69,70); nur 1 - 10 % derselben erreicht als funktionsfähige mRNS das Zytoplasma, nachdem sie im Zellkern noch einer Reihe von Modifikationsprozessen unterzogen wurde (1,13,21,40,70). So entsteht eine charakteristische, als Kopf bezeichnete Nucleotidgruppe am 5'-Ende, und die für mRNS typischen Poly(A)-Sequenzen werden ans 3'-Ende angelagert. Darüber hinaus werden intervenierende Sequenzen aus dem mRNS-Strang entfernt und einige Adenylreste - vorwiegend am 5'-Ende - methyliert.

1.1.2. Translation

Bei der großen Anzahl von 10^3 - $2x10^4$ verschiedenen mRNS-Molekülen pro Zelle (62,70) können an deren Ribosomen ebensoviele, verschiedene Proteine synthetisiert werden.

In den einzelnen Geweben liegen jeweils unterschiedliche Mengen (10 - 80 %) der vom Kern ins Zytoplasma transportierten mRNS in freier, d.h. nicht an Ribosomen gebundener Form vor (19,79,80). Diese freie mRNS kann erst nach Anlagerung an die Ribosomenuntereinheiten in die entsprechenden Aminosäuresequenzen der zu synthetisierenden Proteine translatiert werden.

Bei der Proteinsynthese werden drei Reaktionsabschnitte voneinander unterschieden: der Kettenstart (Initiation), die Kettenverlängerung (Elongation) und der Kettenabschluß (Termination) (2,15,83).

In der Initiation lagern sich die 40 S und die 60 S Ribosomenuntereinheiten an den Ribosomenbindungsabschnitt der

mRNS an; darüber hinaus tritt die mit N-Formyl-Methionin beladene, spezifische Start-tRNS mit ihrem Anticodon in Beziehung zum Startcodon AUG der mRNS. Außerdem sind für den Kettenstart Magnesiumionen, Guanosintriphosphat und als Initiationsfaktoren bezeichnete Proteine erforderlich.

Anschließend erfolgt die Kettenverlängerung des in Synthese befindlichen Proteins vom Amino- zum C-terminalen Ende. Dabei wird die mRNS vom 5'- zum 3'-Ende abgelesen; der tRNS-Strang läuft antiparallel dazu. Die mRNS wird jeweils um eine Codonlänge so gegen das Ribosom verschoben, daß das nächste Basentriplett zum Anticodon der zugehörigen tRNS in Beziehung treten kann. Die Kettenverlängerung erfordert die Anwesenheit bestimmter Proteine, sogenannter Elongationsfaktoren, sowie von Magnesium- und Kaliumionen und Guanosintriphosphat.

Erreicht der Ablesevorgang schließlich das Terminationscodon der mRNS, dann kommt es unter dem Einfluß eines bestimmten Proteins, des Terminationsfaktors, zum Kettenabschluß und das fertiggestellte Polypeptid löst sich mit Hilfe eines weiteren Proteins, des Dissoziationsfaktors, vom Ribosom ab.

Die Geschwindigkeit der Translation wurde verschiedentlich in-vitro und in-vivo gemessen. So wird für die Translation von Ovalbumin-mRNS und Hämoglobin-mRNS in-vitro bei 25°C ein Wert von 0,8 Aminosäuren pro Sekunde angegeben (43,59). Die Translation von Hämoglobin-mRNS (32) und Myosin-mRNS (54) in-vitro bei 37°C erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 4 - 5 Aminosäuren pro Sekunde. Für intakte Zellen wurden Meßwerte von 4 - 6 Aminosäuren pro Sekunde erhalten (22,31,41,60).

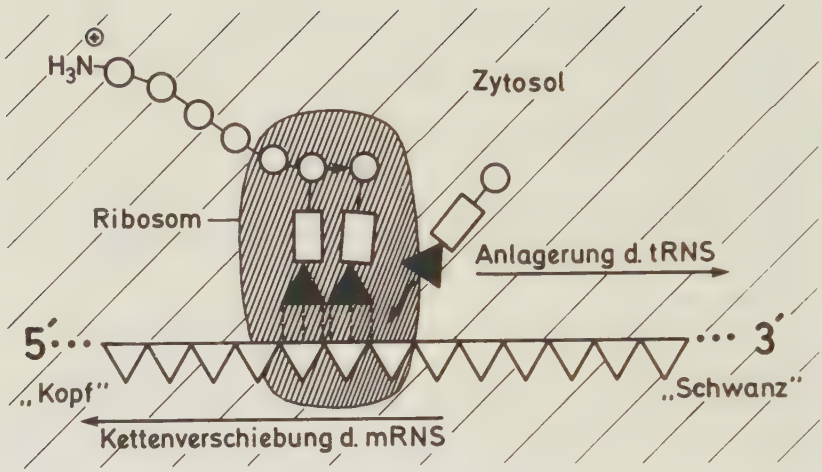


Abb.1: Die mRNS wird jeweils um eine Codonlänge so gegen das Ribosom verschoben, daß ihr nächstes Basentriplett zum Anticodon der zugehörigen tRNS in Beziehung treten kann. Auf diese Weise gelangt die in der Aminosäuresequenz folgende Aminosäure in so enge räumliche Beziehung zur nascierenden Polypeptidkette, daß sich eine weitere Peptidbindung ausbilden kann.

Symbole:

Codon der mRNS
Anticodon der tRNS
Aminosäure
Polypeptidkette
mit Aminosäure beladene tRNS

In der Zelle retinierte Proteine werden in der Regel an freien Polyribosomen synthetisiert, aus der Zelle exportierte Proteine dagegen an membrangebundenen Polyribosomen (82).

1.1.3. Post-translationale Proteinmodifikationen

Nach der Translation werden die neusynthetisierten Proteine in der Regel noch modifiziert. So kommt es zum Beispiel zu einer Abspaltung von Aminosäuresequenzen, Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung u.a. (14,24,29,55,63,71,73, 82). Da sich die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der Proteinsynthese auf der Ebene der Translation beschäftigt, soll hier auf das Kapitel der post-translationalen Proteinmodifikationen nicht näher eingegangen werden.

1.2. Genexpression im menschlichen Hoden und im humanen hepatozellulären Karzinom: Ausgangspunkt und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die Molekulargenetik trägt in jüngster Zeit erheblich zur Erweiterung unserer Kenntnisse über pathophysiologische Zusammenhänge bei und eröffnet darüber hinaus völlig neue therapeutische Ansatzmöglichkeiten in der Medizin (zum Beispiel Synthese von Humaninsulin, Interferon, HGH durch Bakterien).

Eine ganz zentrale Stellung nimmt in der Molekulargenetik die Isolierung von mRNS und deren Translation in einem zellfreien System zum Nachweis ihrer funktionellen Integrität ein. Die Isolierung von mRNS erlaubt, die Unterschiede in der Proteinsynthese der verschiedenen Gewebe zu studieren. Darüber hinaus stellt intakte mRNS das Ausgangsmaterial für die Synthese complementärer DNS (cDNS) dar, welche über Bakteriophagen in ein Bakteriengenom eingeschleust werden kann und in der Bakterienzelle die Synthese des von ihr codierten Proteins zu steuern vermag.

Die Isolierung intakter Polyribosomen und mRNS und deren zellfreie Translation wurde bisher vor allem an tierischen Geweben durchgeführt, und zwar aus Leber (5,9,18,56,66,72, 79,80,81), Herz (84), Nieren (34,58), Gehirn (6,7), Eileiter und Eierstöcken (13,26,49,59,60), Retikulozyten (13,42,48,76), Pankreas (17,28), Skelettmuskel (4,30,50,52,64,68), Dottersack (51), Myelom der Maus (75,77) und Hepatomen der Ratte (8,33,37,67). Über die Genexpression in menschlichen Geweben ist mit Ausnahme der Plazenta (10,11,38) jedoch kaum etwas bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Genexpression normaler und maligner, neoplastischer Gewebe des Menschen näher zu untersuchen.

Um experimentelle Erfahrungen zu sammeln, wurde zunächst mRNS aus menschlichem Hoden, einem "Normalgewebe", isoliert. Ein wesentlicher Vorzug menschlichen Hodengewebes gegenüber anderen Geweben humanen Ursprungs besteht darin, daß Hoden in zur Präparation ausreichender Quantität von operativen Eingriffen (plastische Orchiektomie bei Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom) erhalten werden kann. Außerdem läßt der Hoden als stoffwechselintensives Organ eine hohe Proteinsyntheserate erwarten und erscheint somit auch aus diesem Grunde zur Isolierung von mRNS besonders interessant.

Da die Molekulargenetik in Zukunft grundlegend dazu beitragen könnte, unser Verständnis von der Pathophysiologie des humanen Tumorstoffwechsels zu erweitern, wird in dieser Arbeit exemplarisch die Entwicklung einer Methodik zur Isolierung von mRNS aus einem humanen, malignen Gewebe beschrieben. Dazu standen eineinhalb Kilogramm Tumorgewebe eines hepatozellulären Karzinoms von einer Patientin zur Verfügung, bei der eine Erhöhung der Tumormarkerproteine AFP, TPA und Ferritin im Serum gefunden wurde. Aufgrund der großen, einheitlichen Tumormasse waren sämtliche Isolierungen von mRNS aus einem einzigen Operationspräparat möglich.

Um die am menschlichen Hoden und humanen hepatozellulären Karzinom erhobenen Befunde mit bisher publizierten Daten vergleichen zu können, wurde mRNS auch aus Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta unter Anwendung der jeweiligen in der Literatur beschriebenen Methode isoliert und zellfrei translatiert.

2. METHODEN

2.1. Isolierung von mRNS

2.1.1. Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden

2.1.1.1. Geräte

Potter-Elvehjem Homogenisator der Firma Braun Melsungen
Sorvall-Zentrifuge mit SS-34 Rotor
Beckman Ultrazentrifuge mit Ti 60 Rotor
Beckman Spektralphotometer

2.1.1.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad.

Im einzelnen wurden bezogen:

von der Firma Merck, Darmstadt:

Magnesiumchlorid
Natriumchlorid
EDTA = Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz
Phenol
Chloroform
Isoamylalkohol
Kaliumhydroxid
Kaliumacetat
Kaliumchlorid
Ethanol
Natriumacetat

von der Firma Serva, Heidelberg:

SDS = Dodecylsulfat Natriumsalz
Hepes = N-2-Hxdroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
Oligo dT-20 = Oligo dT-Cellulose

von der Firma Sigma, St. Louis, U.S.A.:

Tris-HCl
Sucrose

von der Firma Seromed, München:

Heparin Natriumsalz

2.1.1.3. Lösungen

Homogenisierungspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	3,03 g	100 mM
NaCl	1,46 g	100 mM
$MgCl_2$	0,25 g	5 mM
Sucrose	21,39 g	250 mM
Heparin	25000 U	100 U/ml

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 7,6 eingestellt und das Volumen mit H_2O auf 250 ml ergänzt.

10 % SDS-Lösung:

10 g SDS wurden in soviel H_2O gelöst, daß man 100 ml Lösungsvolumen erhielt.

Extraktionspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	6,06 g	100 mM
NaCl	2,92 g	100 mM
EDTA	0,19 g	1 mM
Heparin	50000 U	100 U/ml

Das pH wurde mit 2 M HCl exakt auf 9,0 eingestellt und das Volumen mit H_2O auf 500 ml aufgefüllt.

Phenolmix:

200 ml geschmolzenes Phenol gab man zusammen mit 200 ml Extraktionspuffer in einen 1000 ml-Schütteltrichter, schüttelte 1/2 Minute kräftig durch und ließ die gesättigte Phenolphase sich absetzen.
Der Phenolmix setzte sich zusammen aus:
50 Volumenteile gesättigtes Phenol
50 Volumenteile Chloroform
1 Volumenteil Isoamylalkohol

20 % Kaliumacetatlösung:

20 g Kaliumacetat wurden in soviel H_2O gelöst, daß man 100 ml Lösungsvolumen erhielt. Das pH wurde mit konzentrierter HCl auf 5,5 eingestellt.

3 M Natriumacetatlösung:

123 g Natriumacetat wurden in soviel H_2O gelöst, daß man 500 ml Lösungsvolumen erhielt. Das pH wurde mit konzentrierter HCl auf 6,0 eingestellt.

100 mM Natriumacetatlösung:

4,1 g Natriumacetat wurden in soviel H_2O gelöst, daß man 500 ml Lösungsvolumen erhielt. Das pH wurde mit 1 M HCl auf 7,0 eingestellt.

Hepes-Puffer zur Elution (je 500 ml wäßrige Lösung):

		Substanzmenge	Endkonzentration
I.	Hepes	2,39 g	20 mM
	KCl	18,64 g	0,5 M
	Das pH wurde mit 2 M KOH auf 7,4 eingestellt.		
II.	Hepes	2,39 g	20 mM
	KCl	5,59 g	0,15 M
	Das pH wurde mit 2 M KOH auf 7,4 eingestellt.		
III.	Hepes	119 mg	1 mM
	Das pH wurde mit 0,1 M KOH auf 7,0 eingestellt.		

0,02 % Na-acid-Lösung:

20 mg Natriumacid wurden in soviel H_2O gelöst, daß man 100 ml Lösungsvolumen erhielt.

0,1 M Kalilauge:

2,81 g KOH wurden in soviel H_2O gelöst, daß man 500 ml Lösungsvolumen erhielt.

Bechergläser und Meßkolben wurden vor Ansetzen der Lösungen mehrmals gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült. Zum Herstellen der Lösungen fand nur bidest. Wasser Verwendung.

Homogenisierungspuffer, Extraktionspuffer und 10 % SDS-Lösung wurden jeweils am Vortage der Aufarbeitung frisch angesetzt. Der Phenolmix wurde erst am Versuchstag unmittelbar vor Beginn der Aufarbeitung hergestellt und zum Schutz vor Oxidation durch Licht mit Aluminiumfolie abgedeckt. Kalilauge und Na-acid-Lösung konnten bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt werden. Kaliumacetatlösung, Natriumacetatlösungen und Hepes-Puffer wurden maximal 2 Monate im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

2.1.1.4. Gewebe

Sämtliche Hoden stammten von Männern im Alter zwischen 48 und 67 Jahren, die an einem metastasierenden Prostatakarzinom erkrankt waren und sich zu therapeutischen Zwecken einer plastischen Orchiektomie unterzogen. Die Hoden wurden unmittelbar nach der Entnahme noch im Operationssaal in ein steriles Behältnis mit eiskalter 0,9 % Natriumchloridlösung gegeben, auf Eis möglichst rasch transportiert und in einem Gefrierschrank bei -60°C maximal 3 Monate gelagert.

2.1.1.5. Isolierungsschritte

Alle Glaswaren (Bechergläser, Meßzylinder, Schütteltrichter Meßpipetten etc.) wurden gründlich mit dest. Wasser gespült und anschließend bei 140°C für mindestens drei Stunden in einen Trockenschrank gestellt, um sie weitgehend frei von Ribonuklease zu bekommen. In der gleichen Absicht wurden nicht so hitzebeständige Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff über Nacht einer Hitze von 80°C ausgesetzt. Während sämtlicher Isolierungsschritte wurden Glovex Einmalhandschuhe getragen, um eine RNase-Kontamination durch die Hände zu vermeiden.

Die Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden erfolgte in Anlehnung an die Methode der Aufarbeitung, wie sie für Rattenleber beschrieben wurde (80).

2.1.1.5.1. Isolierung der Mikrosomenfraktion

In diesem Abschnitt der Aufarbeitung wurde darauf geachtet, daß das Gewebsmaterial ununterbrochen eine Kälte von etwa 4°C hatte. Dazu wurden sämtliche Gläser, die Gewebe enthielten, während der einzelnen Bearbeitungsschritte soweit möglich, auf alle Fälle aber zwischen diesen und auf dem Transport in einen Eimer mit Eis gestellt. Von besonderer Bedeutung war darüber hinaus sehr rasches Arbeiten.

In sämtlichen Experimenten wurde ein ganzer Hoden (Durchschnittsgewicht 15,9 g) verwendet. Das gefrorene Gewebe wurde in eiskaltem Homogenisierungspuffer kurz angetaut und in noch weitgehend gefrorenem Zustand mit einer Schere rasch in feine Streifen geschnitten. Das Volumen des Homogenisierungspuffers wurde auf das 2,5-fache des Gewebsgewichts ergänzt, und das Gemisch aus Gewebe und Puffer auf zwei Portionen verteilt in einen 30 cm^3 fassenden Glaskolben gegeben und in diesem mit je 3 "strokes" eines Potter Elvehjem Homogenisators homogenisiert. Zellkerne und Mitochondrien wurden durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/20 min/4°C) aus dem Homogenat entfernt. Der resultierende Überstand (PMS = postmitochondrial supernatent) wurde durch Dekantieren abgetrennt und über Glaswatte gefiltert, um flottierende Lipoproteine zu entfernen. Dann wurde der PMS auf zwei Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und in einem Beckman Ti 60 Rotor zentrifugiert (42000 rpm/70 min/4°C), um mikrosomale Pellets zu erhalten.

2.1.1.5.2. Phenolextraktion

Die Phenolextraktion erfolgte in Anlehnung an Aviv (3).

Nach der Ultrazentrifugation wurde der postmikrosomale Überstand abgekippt und verworfen. Die mikrosomalen Pellets wurden mit einem Glasstab von der Wand der Ultrazentrifugenröhrchen abgelöst und in je 5 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Dann wurden die beiden Pellets vereinigt und in einem Glashomogenisator durch behutsames Hin- und Herbewegen des locker passenden Stempels homogenisiert. Forciertes Vorgehen mit einem zu streng passenden Stempel vermochte einen großen Anteil der mRNS-Ausbeute zu zerstören. Ultrazentrifugenröhrchen und Glashomogenisator wurden noch einmal mit etwas Extraktionspuffer gespült, um das restliche Mikrosomenmaterial zu entfernen. Dann wurde die vereinigte Mikrosomensuspension mit Extraktionspuffer auf das 4-fache Volumen des Gewebsgewichts ergänzt.

Alle nun folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur vorgenommen, da gelöstes SDS in der Kälte ausfällt. 1/10 10 % SDS-Lösung wurde zur Mikrosomensuspension gegeben, um die Proteine von den Ribonukleinsäure-Protein-Komplexen abzuspalten und zu denaturieren, was sich daran zeigte, daß die Lösung nach kurzem Umrühren klar wurde. Dann wurde zum Gesamtvolumen ebensoviel Phenolmix hinzugefügt, und das Ganze 15 Minuten lang gerührt. Durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 (10000 rpm/ 10 min/ 23^{o}C) wurde die schwerere, das denaturierte Protein enthaltende Phenolphase von der leichteren wäßrigen Phase, in der die Ribonukleinsäuren gelöst sind, abgetrennt. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde die wäßrige Phase vorsichtig abgesaugt und dabei darauf geachtet, daß weder Material aus der Phenolphase noch aus der schmalen Interphase mitgenommen wurde; die letzten 3 mm der wäßrigen Phase wurden aus diesem

Grund zurückgelassen. Zur abgetrennten wäßrigen Phase wurde wiederum dasselbe Volumen Phenolmix gegeben, das Ganze nochmals wie oben beschrieben gerührt und zentrifugiert und die nun erhaltene wäßrige Phase erneut abgesaugt. 1/10 20 % Kaliumacetatlösung wurde zur wäßrigen Phase gegeben, um in ihr eine Endkonzentration von 2 % Kaliumacetat zu erhalten. Durch das niedrige pH der Kaliumacetatlösung (pH 5,5) wurde das pH der Nukleinsäurelösung in die Nähe des Neutralpunktes verschoben, da Nukleinsäuren im alkalischen Bereich nicht ausfallen. Nach Zugabe von 2 Volumina Ethanol (auf -20°C vorgekühlt) ließ man die RNS über Nacht bei -20°C präzipitieren.

2.1.1.5.3. Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS

Die präzipitierte RNS wurde durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/20 min/-20°C) gesammelt. Das Pellet wurde in 3 M Natriumacetatlösung von 0°C (ca. 20 - 30 ml) mit einem Glasstab resuspendiert, 10 Minuten in einem Eiswasserbad bei 0°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/20 min/0°C) erneut gesammelt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das letzte Pellet wurde in 6 ml 100 mM Natriumacetatlösung von Raumtemperatur gelöst, und nach Zugabe von 2 Volumina (12 ml) vorgekühltem Ethanol ließ man die RNS wieder über Nacht bei -20°C präzipitieren.

2.1.1.5.4. Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose

Die Chromatographie wurde mit folgendem System durchgeführt: Als Reservoir für die Lösungen diente eine 50 ml Perfusorspritze. Aus dieser Spritze floß die Lösung über einen Infusionsschlauch mit Rendelschraube, an der die Flußgeschwindig-

keit reguliert werden konnte, in eine 2 ml Spritze, die durch eine Kanüle von 1 mm Durchmesser, welche einen Gummistopfen durchbohrte, mit dem Infusionsschlauch in Verbindung stand. An der Ausflußöffnung der 2 ml Spritze wurde das Eluat aufgefangen.

Auf dem Boden der 2 ml Spritze lag ein Stück Nylonstoff, das aus einem Nylonhemd herausgeschnitten wurde. Darüber befanden sich 500 mg Oligo-dT-Cellulose, die durch den Nylonstoff zurückgehalten wurden. Nukleinsäuremoleküle jeglicher Größe hingegen konnten die Poren des Nylonnetzes passieren.

Vor jeder Chromatographie wurde der Infusionsschlauch von der 2 ml Spritze abgetrennt. Dann wurden die 50 ml Perfusorspritze und der Infusionsschlauch mit 200 ml bidest. Wasser gespült. Nachdem die Oligo-dT-Cellulose mit 3 Mal je 1,5 ml 0,1 M KOH regeneriert wurde, schloß man die Säule wieder und spülte die ganze Säule solange mit bidest. Wasser (ca. 20 - 30 ml), bis das pH des Säuleneluats bei 7 lag (Indikatorpapier). Anschließend wurde die Säule mit 0,5 M KCl, 50 mM Hepes, pH 7,4 äquilibriert (ca. 40 - 50 ml).

Inzwischen wurde das RNS-Präzipitat durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/20 min/-20^{o}C) gesammelt. Das Pellet wurde durch Einblasen von Stickstoff getrocknet und danach in ca. 15 ml 0,5 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7,4 von Raumtemperatur gelöst. Besonders gut löste sich die RNS, wenn man das Pellet vor Zugabe des Puffers mit einem Glasstab zerpflückte. Anschließend wurde die RNS für 10 Minuten auf 65^{o}C erhitzt, um RNS-Aggregate aufzulösen, danach rasch in einem Eiswasserbad auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Darauf wurde die optische Dichte der Lösung in einem Beckman Spektralphotometer gemessen, welche bei etwa 15 OD_{260nm}/ml liegen sollte.

Die in der Säule befindliche, äquilibrierte Oligo-dT-Cellulose wurde in die RNS-Lösung gegeben, und das Ganze 20 Minuten lang bei Raumtemperatur unter öfterem Umrühren mit einem Glasstab inkubiert. Diese Zeit genügte zur Ausbildung der Bindungen zwischen den Oligo-Thymidyl-Resten der Cellulose und den Poly-Adenyl-Resten der mRNS. Anschließend gab man die Suspension mit Hilfe einer abgebrochenen Pasteurpipette nach und nach in die 2 ml Spritze der Säule, bis alles Material aufgetragen war. Danach wurde die Säule sofort geschlossen und mit 50 ml 0,5 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7,4, hierauf mit 30 ml 0,15 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7,4 gespült, um unspezifisch gebundenes Material von der Säule zu entfernen. Schließlich wurde die adsorbierte, Poly(A)-enthaltende mRNS durch Erniedrigung der KCl-Konzentration im Hepes-Puffer auf Null unter Verwendung von 1 mM Hepes, pH 7,0 eluiert. Die eluierte mRNS wurde in 20 Fraktionen von je 0,25 ml in Eppendorf Reaktionsgefäßen gesammelt. Ihre optische Dichte wurde bei 260 nm in einem Beckman Spektralphotometer gemessen. Die mRNS wurde bei -60°C aufbewahrt viele Monate lang ohne jeglichen Verlust an translatorischer Aktivität.

2.1.2. Isolierung von mRNS aus menschlichem Hepatom

2.1.2.1. Geräte

Es wurde die in 2.1.1.1. beschriebenen Geräte benutzt.

2.1.2.2. Chemikalien

Es fanden dieselben Chemikalien Verwendung, die in 2.1.1.2. aufgeführt wurden.

2.1.2.3. Lösungen

Es wurden dieselben Lösungen wie in 2.1.1.3. beschrieben verwendet mit einer Ausnahme, daß der Homogenisierungspuffer 0,5 mM EDTA (entsprechend 46,5 mg/250 ml) zusätzlich enthielt.

2.1.2.4. Gewebe

Sämtliches Tumorgewebe stammte von einer 45-jährigen Patientin, die an einem hepatozellulären Karzinom erkrankt war. Die Patientin war bereits 1 1/2 Jahre vor Manifestation des hepatozellulären Karzinoms wegen einer bioptisch gesicherten fokal nodulären Hyperplasie in ärztlicher Beobachtung, welche sie unter langjähriger Einnahme von Ovulationshemmern erworben hatte. Am Ende dieses Beobachtungszeitraums entwickelte sich innerhalb von 4 Wochen ein ausgedehnter, die Bauchdecken vorwölbender Tumor im Epigastrium. Arteriographisch war der Tumor dem linken Leberlappen zuzuordnen. Die Laparotomie bestätigte das Ergebnis der Angiographie, deckte zusätzlich aber zwei faustgroße Metastasen im rechten Leberlappen auf. Da der Primärtumor sich an die Lappengrenze hielt, konnte er durch Totalresektion des linken Leberlappens

radikal entfernt werden. In der gleichen Sitzung wurden die beiden Metastasen durch Elektroresektion aus dem Parenchym des rechten Leberlappens entfernt. Die Gesamtdauer des operativen Eingriffs betrug etwa fünf Stunden.

Das Operationspräparat, das wir Herrn Prof. R. Pichlmayr vom Department Chirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover verdanken, wurde sofort nach der Entnahme aus dem Situs noch im Operationssaal in eine sterile Schale mit reichlich eiskalter physiologischer Natriumchloridlösung gegeben, welche für den Transport in das Pathologische Institut der Medizinischen Hochschule Hannover in eine Wanne mit viel Eis eingebettet wurde. Dort wurde das Präparat, das in toto 3540 g wog, in zwei annähernd gleiche Hälften geteilt. Die Schnittfläche offenbarte, daß der Tumor den gesamten Leberlappen ausfüllte und nur mehr von einem schmalen, kaum 5 mm messenden subkapsulären Parenchymsaum umgeben war. Der Tumor selbst bot ein ziemlich buntes makroskopisches Bild: Es wechselten weißliche bis wachsgelbe Bezirke mit grüngelb-bräunlich verfärbten, in denen offensichtlich Gallepigment vorhanden war, beide von fischfleischartiger Konsistenz. Daneben kamen sehr weiche, fast zerfließliche Anteile vor, welche hämorrhagisch verfärbt waren.

Die eine Hälfte des Tumors wurde sofort in Formalin fixiert und zur histologischen Untersuchung weiterverarbeitet. Die andere Hälfte war für die biochemischen Untersuchungen bestimmt: Dazu wurden ausschließlich Bezirke von wachsgelber Farbe und fischfleischartiger Konsistenz aus dem Präparat herausgeschnitten und in Portionen von je 5 - 10 Gramm auf ca. 30 Szintillationsröhrchen verteilt. In diesen Gefäßen wurde das Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend auf Trockeneis verpackt von der Medizinischen Hochschule Hannover in das Klinikum Großhadern trans-

portiert, wo es dann bis zur Aufarbeitung in einem Gefrierschrank bei -60°C gelagert wurde. Von der Entnahme des Operationspräparates aus dem Situs bis zum Tiefgefrieren des Gewebes verging nicht mehr als eine Stunde.

Die histologische Untersuchung des Operationspräparates am Pathologischen Institut der Medizinischen Hochschule Hannover ergab in allen Gewebsarealen mit den oben beschriebenen makroskopischen Eigenschaften mikroskopisch den Befund eines hepatozellulären Karzinoms. In einem Schnitt wurden darüber hinaus Strukturen gefunden, die an ein Rhabdomyosarkom erinnerten.

Im weiteren Krankheitsverlauf traten bereits einen Monat nach der Operation multiple Lungenmetastasen auf. Die Patientin verstarb drei Monate post operationem.

2.1.2.5. Isolierungsschritte

Es wurden die gleichen Vorbereitungen getroffen wie in 2.1.1.5. beschrieben.

2.1.2.5.1. Isolierung der Mikrosomenfraktion

Bezüglich der Kälteexposition des Gewebsmaterials wurde wie in 2.1.1.5.1. verfahren.

In sämtlichen Experimenten wurden 5 - 10 Gramm Hepatomgewebe verwendet. Das gefrorene Tumorgewebe wurde in eiskaltem Homogenisierungspuffer rasch aufgetaut und nach Exzision von hämorrhagisch verfärbtem Material (entspricht Tumornekrosen) mit einer Schere in feine Streifen geschnitten. Anschließend wurde wie in 2.1.1.5.1. beschrieben weiterverfahren.

2.1.2.5.2. Isolierung des postmitochondrialen Überstandes

Alternativ zur Isolierung der Mikrosomenfraktion wurde die Ultrazentrifugation unterlassen und somit der postmitochondriale Überstand (PMS = postmitochondrial supernatent) zur Gewinnung der gesamten zytoplasmatischen RNS direkt der Phenolextraktion zugeführt.

2.1.2.5.3. Phenolextraktion

Mit den mikrosomalen Pellets wurde entsprechend den Ausführungen in 2.1.1.5.2. verfahren.

Zur Gewinnung der gesamten zytoplasmatischen RNS aus dem PMS wurde dieser mit 3 Volumina Extraktionspuffer von Raumtemperatur verdünnt. Anschließend wurde 1/10 10 % SDS-Lösung zugegeben und entsprechend 2.1.1.5.2. weiterverfahren.

2.1.2.5.4. Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS oder zytoplasmatischen Gesamt-RNS

Das Waschen der mikrosomalen bzw. zytoplasmatischen Gesamt-RNS erfolgte in gleicher Weise wie in 2.1.1.5.3. beschrieben.

2.1.2.5.5. Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose

Die Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose entsprach den Ausführungen in 2.1.1.5.4.

2.1.3. Isolierung von mRNS aus Rattenherzen

Die Isolierung von mRNS aus Rattenherzen erfolgte nach der Methode von Zähringer (84).

2.1.3.1. Geräte

Es wurden die in 2.1.1.1. beschriebenen Geräte benutzt. Zusätzlich wurde ein Ultra-Turrax der Firma Janke ν Kunkel, Staufen eingesetzt.

2.1.3.2. Chemikalien

Es fanden die in 2.1.1.2. aufgeführten Chemikalien Verwendung.

Zusätzlich wurde von der Firma Merck, Darmstadt bezogen:

Triton X-100

2.1.3.3. Lösungen

Homogenisierungspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	0,303 g	10 mM
KCl	5,59 g	300 mM
$MgCl_2$	0,25 g	5 mM
Sucrose	21,39 g	250 mM
Triton X-100	2,5 g	1 %
Heparin	25000 U	100 U/ml

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 7,4 eingestellt und das Volumen mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt.

1,4 M Sucrose in TKMA:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	3,03 g	50 mM
KCl	0,93 g	25 mM
$MgCl_2$	0,51 g	5 mM
Sucrose	205,38 g	1,4 M
NH_4Cl	13,37 g	0,5 M

Das pH wurde auf 7,4 eingestellt, das Volumen auf 500 ml aufgefüllt.

Extraktionspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	6,06 g	100 mM
NaCl	8,77 g	300 mM
EDTA	0,19 g	1 mM
Heparin	50000 U	100 U/ml
SDS	0,5 g	0,1 %

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 8,3 eingestellt, das Volumen mit H_2O auf 500 ml aufgefüllt.

0,2 M NaCl / Ethanol (1:2, v/v):

0,2 M NaCl-Lösung enthielt 5,84 g NaCl pro 500 ml wäßriger Lösung. 500 ml dieser Lösung wurden mit 1000 ml Ethanol vermischt und anschließend bei -20°C gelagert.

10 % SDS-Lösung, Phenolmix, 20 % Kaliumacetatlösung, 0,02 % Na-acid-Lösung, 0,1 M Kalilauge sowie sämtliche Hepes-Puffer wurden entsprechend 2.1.1.3. hergestellt.

2.1.3.4. Gewebe

Sämtliches Herzgewebe stammte von männlichen Sprague-Dawley Ratten (150 g Körpergewicht / 45 Tage alt), die über Nacht gefüttert wurden. Die Tiere wurden durch Dekapitieren geschlachtet, rasch entblutet, und anschließend wurden die Herzen sofort entnommen. Der gesamte Schlachtvorgang dauerte für 20 Ratten nicht länger als 15 Minuten. Die Herzen wurden in eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen und sofort weiterverarbeitet.

2.1.3.5. Isolierungsschritte

Es wurden die gleichen Vorbereitungen getroffen wie in 2.1.1.5. beschrieben.

2.1.3.5.1. Isolierung der Mikrosomenfraktion

Bezüglich der Kälteexposition des Gewebsmaterials galt dasselbe wie in 2.1.1.5.1.

In sämtlichen Experimenten wurden zehn bis zwanzig Rattenherzen verwendet. Sofort nach dem Waschen in eiskaltem Homogenisierungspuffer wurden die Rattenherzen gepoolt und mit einer Schere rasch in feine Streifen geschnitten. Das Gewebsgewicht wurde durch Einwiegen der Rattenherzen in 20 ml Homogenisierungspuffer ermittelt. Anschließend wurde das Volumen des Homogenisierungspuffers auf das 7-fache des Gewebsgewichts ergänzt, und das Gemisch aus Gewebe und Puffer auf zwei Portionen verteilt in einen 30 cm^3 fassenden Glaskolben gegeben. Die Homogenisation wurde zunächst in einem Ultra-Turrax bei einer Leistung von 170 W (2 Mal 10 Sekunden) vorgenommen, dann mit 3 "strokes" eines Potter Elvehjem Homogenisators vervollständigt. Zellkerne, Mitochondrien und Myofibrillen wurden

durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/ 20 min/4°C) aus dem Homogenat entfernt. Der resultierende PMS wurde abgekippt und auf zwei Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und anschließend direkt (42000 rpm/70 min/4°C) oder durch ein Kissen aus 2 ml 1,4 M Sucrose in TKMA (50000 rpm/120 min/4°C) in einem Beckman Ti 60 Rotor zentrifugiert.

2.1.3.5.2. Phenolextraktion

Nach der Ultrazentrifugation wurde der postmikrosomale Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann wurde entsprechend 2.1.1.5.2. weiterverfahren.

2.1.3.5.3. Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS

Die präzipitierte RNS wurde durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/20 min/-20°C) gesammelt. Das Pellet wurde in 0,2 M NaCl / Ethanol (1:2, v/v) von -20°C (ca. 20 - 30 ml) mit einem Glasstab resuspendiert und anschließend durch Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12500 rpm/20 min/-20°C) erneut gesammelt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt.

2.1.3.5.4. Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose

Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet durch Einblasen von Stickstoff getrocknet und anschließend in 10 bis 20 ml 0,5 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7,4 von Raumtemperatur gelöst. Im übrigen wurde ganz entsprechend 2.1.1.5.4. verfahren.

2.1.4. Isolierung von mRNS aus Rattenleber

Die Isolierung von mRNS aus Rattenleber erfolgte nach der Methode von Zähringer (80).

2.1.4.1. Geräte

Es wurden die in 2.1.1.1. aufgeführten Geräte benutzt.

2.1.4.2. Chemikalien

Es wurden ausschließlich die in 2.1.1.2. aufgeführten Chemikalien verwendet.

2.1.4.3. Lösungen

Homogenisierungspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	3,03 g	100 mM
NaCl	1,46 g	100 mM
$MgCl_2$	0,25 g	5 mM
Sucrose	21,39 g	250 mM
EDTA	9,31 mg	0,1 mM
Heparin	37,5 mg	150 µg/ml

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 7,6 eingestellt und das Volumen mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt.

Extraktionspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	6,06 g	100 mM
NaCl	2,92 g	100 mM
EDTA	0,19 g	1 mM
Heparin	25 mg	50 µg/ml

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 9,0 eingestellt und das Volumen mit H_2O auf 500 ml aufgefüllt.

Die übrigen Lösungen wurden in 2.1.3.3. bzw. 2.1.1.3. beschrieben.

2.1.4.4. Gewebe

Sämtliches Gewebe stammte von männlichen Sprague-Dawley Ratten (150 g Körpergewicht / 45 Tage alt), die über Nacht fasteten. Die Tiere wurden durch Dekapitieren geschlachtet, rasch entblutet, und anschließend wurde die Leber sofort entnommen. Der gesamte Schlachtvorgang dauerte für 6 Ratten ungefähr fünf Minuten. Die Leber wurde in eiskaltem Homogenisierungspuffer gewaschen und anschließend sofort weiter aufgearbeitet.

2.1.4.5. Isolierungsschritte

Es wurden die gleichen Vorbereitungen getroffen wie in 2.1.1.5. beschrieben.

2.1.4.5.1. Isolierung der Mikrosomenfraktion

Bezüglich der Kälteexposition des Gewebsmaterials galt dasselbe wie in 2.1.1.5.1.

Nach dem Waschen in eiskaltem Homogenisierungspuffer wurden sechs Rattenlebern gepoolt und mit einer Schere rasch in feine Streifen geschnitten. Das Gewebsgewicht wurde durch Einwiegen der Leber in 20 ml Homogenisierungspuffer ermittelt; anschließend wurde das Volumen auf das 2,5-fache des Gewebsgewichts aufgefüllt. Das Gemisch aus Gewebe und Puffer wurde auf drei Portionen verteilt in einen 30 cm^3 fassenden Glaskolben gegeben und mit 3 "strokes" eines Potter

Elvehjem Homogenisators schonend (locker passender Teflonstab!) homogenisiert. Nach Zentrifugation in einem Sorvall SS-34 Rotor (12000 rpm/20 min/4°C) wurde der PMS abgekippt, über Glaswolle gefiltert, auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und in einem Beckman Ti 60 Rotor zentrifugiert (42000 rpm/70 min/4°C).

2.1.4.5.2. Phenolextraktion

Bei der Phenolextraktion wurde ganz entsprechend 2.1.1.5.2. verfahren.

2.1.4.5.3. Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS

Das Waschen der mikrosomalen Gesamt-RNS erfolgte wie in 2.1.3.5.3. beschrieben.

2.1.4.5.4. Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose

Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet durch Einblasen von Stickstoff getrocknet und anschließend in 90 ml 0,5 M KCl, 20 mM Hepes, pH 7,4 aufgelöst, um eine OD_{260nm} der Lösung von etwa 15 zu erhalten. Die Lösung wurde wegen ihres großen Volumens in zwei Mal 45 ml aufgeteilt und auf zwei getrennte Säulen aufgetragen. Ansonsten wurde ganz entsprechend 2.1.1.5.4. verfahren.

2.1.5. Isolierung von mRNS aus menschlicher Plazenta

Die Isolierung von mRNS aus menschlicher Plazenta erfolgte in Anlehnung an die Methode von Boime (10,11).

2.1.5.1. Geräte

Es wurden die in 2.1.1.1. aufgeführten Geräte benutzt.

2.1.5.2. Chemikalien

Es wurden die in 2.1.1.2. aufgeführten Chemikalien verwendet.

Zusätzlich wurde von der Firma Merck, Darmstadt bezogen:

2-Mercaptoethanol

2.1.5.3. Lösungen

Homogenisierungspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	1,51 g	50 mM
KCl	0,093 g	5 mM
$MgCl_2$	0,25 g	5 mM
Sucrose	75,31 g	880 mM
2-Mercaptoethanol	0,137 g	7 mM
EDTA	0,047 g	0,5 mM
Heparin	25000 U	100 U/ml

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 7,7 eingestellt, das Volumen mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt.

Extraktionspuffer:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	3,03 g	100 mM
NaCl	1,46 g	100 mM

Das pH wurde mit 2 M HCl auf 8,5 eingestellt, das Volumen mit H_2O auf 250 ml aufgefüllt.

Die übrigen Lösungen wurden in 2.1.3.3. bzw. 2.1.1.3. beschrieben.

2.1.5.4. Gewebe

Das plazentare Gewebe stammte von einer Schnittentbindung. Sofort nach der Geburt wurde die Plazenta für den Transport vom Kreißsaal ins Labor auf Eis gelegt. Im Labor wurde die Plazenta dann rasch in Würfel von 2 cm geschnitten. Diese Würfel wurden in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung mehrmals gründlich ausgewaschen, um möglichst viel Blut zu entfernen. Danach wurde das Gewebe durch ein Drahtgitter von 1,5 mm Porengröße gedrückt, um für die weitere Aufarbeitung von Bindegewebe befreite plazentare Zotten zu erhalten.

2.1.5.5. Isolierungsschritte

Es wurden die gleichen Vorbereitungen getroffen wie in 2.1.1.5. beschrieben.

2.1.5.5.1. Isolierung des postmitochondrialen Überstandes

Bezüglich der Kälteexposition des Gewebsmaterials wurde wie in 2.1.1.5.1. verfahren.

Etwa 20 g plazentares Zottengewebe wurde in 1,5 Volumina Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines Potter Elvehjem Homogenisators drei Minuten lang homogenisiert. Dann wurde das Homogenat in einem Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert (8500 rpm/10 min/4°C). Der resultierende PMS wurde aus den Zentrifugenröhrchen abgekippt und mit 5 Volumina Extraktionspuffer verdünnt.

2.1.5.5.2. Phenolextraktion

Zum verdünnten PMS wurde 1/10 10 % SDS-Lösung gegeben und anschließend entsprechend 2.1.1.5.2. weiterverfahren.

2.1.5.5.3. Waschen der zytoplasmatischen Gesamt-RNS

Das Waschen der zytoplasmatischen Gesamt-RNS erfolgte gemäß Kapitel 2.1.3.5.3.

2.1.5.5.4. Abtrennung der mRNS von der Gesamt-RNS durch Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose

Die Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose wurde entsprechend 2.1.1.5.4. vorgenommen.

2.2. In-vitro Translation von mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System

2.2.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad.

Im einzelnen wurden bezogen:

von New England Nuclear, 6072 Dreieich:

^{35}S L-Methionin, SA 835 Ci/mmol

von Amersham Radiochemical Centre, 33 Braunschweig:

Rabbit Reticulocyte Cell-Free System

von der Firma Merck, Darmstadt:

Kaliumchlorid
Trichloressigsäure (= TES)
Ameisensäure
H_2O_2 (30 %)
PPO (= 2,5-Diphenyloxazol)
POPOP
Toluol
Ethanol
Diethylether

2.2.2. Lösungen

850 mM Kaliumchloridlösung:

6,34 g KCl pro 100 ml wäßrige Lösung

10 % TES-Lösung:

100 g TES pro 1000 ml wäßrige Lösung

5 % TES-Lösung:

50 g TES pro 1000 ml wäßrige Lösung

Lösung zum Bleichen:

100 ml 10 % TES-Lösung
50 ml Ameisensäure
50 ml H_2O_2 (30 %)

Die aufgeführten wäßrigen Lösungen wurden alle mit Aqua bidest. angesetzt.

Ethanol/Ether (1:1, v/v)

Szintillationslösung:

12,2 g PPO und 0,7 g POPOP wurden in ein gallon (entspricht 3,78 l) Toluol gelöst.

2.2.3. Vorgehen

2.2.3.1. Inkubation von mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System

Die Inkubation von mRNS im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System erfolgte in Anlehnung an Pelham and Jackson (61).

Für sämtliche Inkubationsansätze wurden Eppendorf Reaktionsgefäße Nr. 3810 verwendet. Pro Inkubation wurden bis zu

30 Ansätze gemacht. Jeder Ansatz enthielt im einzelnen:

16 µl Retikulozyten-Lysat
4 µl ^{35}S L-Methionin-Lösung
2,5 µl 850 mM KCl-Lösung
4 µl mRNS in wäßriger Lösung

In jeder Inkubation wurde ein Ansatz ohne mRNS (Leerwert) und ein Ansatz mit mRNS von bekannter proteinsynthetisierender Aktivität (Kontrollwert) mitgeführt.

Sämtliche Lösungen und Reaktionsansätze wurden während der Pipettierschritte in eine Wanne mit Eis gestellt. Zum Pipettieren wurden ausschließlich Hamilton Mikroliterspritzen verwendet. Die gesamten Pipettiervorgänge nahmen etwa 20 Minuten in Anspruch.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für die Inkubation in ein Wasserbad von 30°C gestellt. Nach 60 Minuten wurde die Inkubation beendet, indem die Reaktionsgefäße rasch auf Eis abgekühlt wurden.

2.2.3.2. Messung der ^{35}S Methionin Inkorporation in das Gesamtprotein

Die Messung der ^{35}S Methionin Inkorporation in das Gesamtprotein erfolgte gemäß einer Modifikation (84) der von Mans and Novelli beschriebenen Methode (44).

Whatmann 3 MM Filterpapierscheiben von 24 mm Durchmesser wurden entsprechend der Nummerierung der Reaktionsgefäße mit einem Bleistift beschriftet und mit Nadeln auf ein Styroporkissen festgesteckt. Von jeder inkubierten Probe wurde mit Hilfe einer Assistent Einmal-Mikropipette ein

Aliquot von 1 µl abgenommen und auf das entsprechend nummerierte Filterpapier aufgetragen. Die Filterpapiere ließ man ca. 10 Minuten an der Luft trocknen, um sie anschließend sequentiell in 10 % TES (4°C/10 min), 5 % TES (4°C/5 min), 5 % TES (90°C/10 min) und 5 % TES (Raumtemperatur = RT/1 min) zu waschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Nadeln entfernt, und die Filterpapiere in die Lösung zum Bleichen gegeben. Die Lösung wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt und eine Stunde in den Kühlschrank gestellt. Nach dem Bleichen wurden die Filterpapiere sequentiell zweimal in Ethanol/Ether (1:1, v/v) (RT/1 min) und einmal in Ether (RT/1 min) gewaschen und anschließend zum Trocknen (ca. 15 min) auf Aluminiumfolie gelegt. Danach wurden die Filterpapiere in Szintillationsgefäße der Firma Packard gegeben, die je 5 ml Szintillationsflüssigkeit enthielten und zur Radioaktivitätsmessung in einen Packard BF 5000 Liquid Szintillationszähler gestellt. Jede Probe wurde 20 Minuten gemessen, um möglichst exakt über die Zeit gemittelte Zählraten zu erhalten.

2.3. Elektrophorese und Fluorographie

Die Elektrophorese erfolgte nach Zähringer (80), die Fluorographie nach Bonner (12).

2.3.1. Geräte

Eppendorf Tischzentrifuge
Wasserbad (auf 100°C erhitzbar)
Elektrophoresekammer
DESAGA Spannungsgerät
Biorad Geltrockner

2.3.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad.

Im einzelnen wurden bezogen:

von der Firma Merck, Darmstadt:

Glycerin
2-Mercaptoethanol
HCl 1 N
ortho-Phosphorsäure 85 %
Methanol
Essigsäure 100 %
DMSO = Dimethylsulfoxid
PPO = Diphenyloxazol

von der Firma Sigma, St. Louis, U.S.A.:

Tris-HCl

von der Firma Serva, Heidelberg:

SDS = Dodecylsulfat Natriumsalz
Acrylamid 2 x krist.
N,N'-Methylenbisacrylamid
Temed = N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Serva Blau R (= Coomassie Brilliant Blue R-250)
Bromphenolblau Natriumsalz

von der Firma Biorad, Richmond, U.S.A.:

Ammoniumpersulfat
Glycin
Filterpapier 18 x 34 cm
Cellophanmembran 18 x 34 cm

von der Firma Kodak, Rochester, U.S.A.:

Kodak X-Omat R Film (XR-5)

vom Amersham Radiochemical Centre, Braunschweig:

^{14}C-markierte Standardproteine (Myosin, Phosphorylase b, Albumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Lysozym), SA 8 - 36 µCi/mg

2.3.3. Lösungen

Acrylamid-Lösung:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Acrylamid	30 g	30 %
N,N'-Methylenbisacrylamid	0,8 g	0,8 %

Das Lösungsvolumen wurde mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt.

5-fach konzentrierter Puffer zur Probenbereitung:

	Substanzmenge	Endkonzentration
Tris-HCl	755 mg	0,31 M
SDS	2 g	10 %
Glycerin	10 ml	50 %
2-Mercaptoethanol	5 ml	25 %

Das pH wurde mit konzentrierter HCl auf 6,8 eingestellt, das Lösungsvolumen mit Aqua bidest. auf 20 ml ergänzt. Mit einigen Kristallen Bromphenolblau wurde der Puffer kräftig angefärbt. Für die Probenbereitung wurde der Puffer in der Regel 1:4 mit Aqua bidest. verdünnt.

10 % SDS-Lösung:

1 g SDS pro 10 ml wäßrige Lösung

10 % Ammoniumpersulfat-Lösung:

1 g Ammoniumpersulfat pro 10 ml wäßrige Lösung

Puffer für Trenngel:

36,3 g Tris-HCl wurden in 48 ml 1 n HCl gelöst, das pH mit 1 n HCl oder 1 n NaOH auf 8,9 eingestellt und das Lösungsvolumen mit Aqua bidest. auf 100 ml ergänzt.

Puffer für Konzentrierungsgel:

5,98 g Tris-HCl und 6,74 ml o-Phosphorsäure wurden in etwas H_2O gelöst, das pH mit konzentrierter NaOH auf 6,7 eingestellt und das Lösungsvolumen mit Aqua bidest. auf 100 ml ergänzt.

Elektrodenpuffer:

4000 ml Elektrodenpuffer enthielten 6 g Tris-HCl, 28,8 g Glycin und 4 g SDS. Das pH wurde mit 1 n HCl oder 1 n NaOH exakt auf 8,3 eingestellt.

Färbelösung:

Zur Herstellung der Färbelösung wurde 1,4 g Serva Blau R-250 in einem Gemisch aus 500 ml Methanol und 500 ml Aqua bidest. gelöst. Zuletzt wurden 70 ml konzentrierte Essigsäure zugesetzt.

Entfärbelösung:

50 ml Methanol und 70 ml konzentrierte Essigsäure wurden vermischt und mit Aqua bidest. auf 1000 ml ergänzt.

20 % PPO in DMSO:

100 g PPO wurde in DMSO gelöst und mit DMSO auf 500 ml Lösungsvolumen aufgefüllt.

Sämtliche Lösungen wurden maximal zwei Monate aufbewahrt. Acrylamid-Lösung, 10 % Ammoniumpersulfat-Lösung, Puffer für Trenngel und Puffer für Konzentrierungsgel wurden im Kühlraum bei 4°C gelagert. Die übrigen, insbesondere die SDS enthaltenden Lösungen wurden dagegen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Acrylamid-Lösung und 20 % PPO in DMSO wurden zum Schutz vor Oxidation durch Licht in braunen Flaschen aufbewahrt.

2.3.4. Herstellung der SDS-Gele

Die Herstellung der Lösungen für die Gele erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

	12,5 % Trenngel	3 % Konzentrierungsgel
Acrylamid-Lösung	8,32 ml	1 ml
Puffer	2,5 ml [+])	1,25 ml [++])
10 % SDS-Lösung	0,2 ml	0,1 ml
Temed	10 µl	5 µl
H_2O	8,87 ml	7,54 ml
10 % APS-Lösung [o])	200 µl	100 µl

[+]) Puffer für Trenngel [++]) Puffer für Konzentrierungsgel
[o]) APS-Lösung = Ammoniumpersulfat-Lösung

Das Gel wurde zwischen zwei vertikal stehende Glasplatten von 16 cm Seitenlänge gegossen, welche links und rechts durch mit Vaseline gefettete Kunststoffstreifen, unten durch Plastelinmasse abgedichtet wurden. Am oberen Ende wurde ein Kunststoffkamm mit 14 Zähnen zwischen die Glasplatten geschoben, um im Gel Taschen zum Auftragen der Proben zu erhalten.

Unmittelbar nach Zugabe der Ammoniumpersulfat-Lösung wurde das Trenngel mit Hilfe einer Pasteurpipette bis zu einer Höhe von etwa 13 cm zwischen die Glasplatten gegossen. Sofort wurde vorsichtig etwas Wasser überschichtet, um eine plane obere Grenzfläche zu erhalten. Dann ließ man dem Gel eine Stunde Zeit zum Polymerisieren.

Anschließend wurde das überschichtete Wasser wieder vollständig entfernt und die Lösung für das Konzentrierungsgel über das bereits polymerisierte Trenngel gegossen. Dem Konzentrierungsgel ließ man 1 1/4 Stunden Zeit zur Polymerisation.

2.3.5. Probenbereitung

Während das Gel polymerisierte, wurden die Proben bereitet. Dazu wurden in maximal 14 Eppendorf Reaktionsgefäße mit Hilfe einer Hamilton Mikrolitерspritze jeweils 25 µl 1:4 verdünnter Puffer zur Probenbereitung pipettiert. Von den zellfrei inkubierten Proben wurden dann mit Hilfe einer Assistent Einmal-Mikropipette jeweils 1 µl hinzupipettiert. Stets wurde auch eine Probe aus Inkubat ohne mRNS (Leerwert) sowie eine Probe aus Inkubat mit mRNS von bekannter proteinsynthetisierender Aktivität bereitet. Darüber hinaus wurde in ein Reaktionsgefäß 2,5 µl einer Lösung ^{14}C-markierter Standardproteine (Myosin, Phosphorylase b, Albumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Lysozym) pipettiert.

Nachdem die zusammenpipettierten Proben in einer Eppendorf Tischzentrifuge eine halbe Minute lang zentrifugiert wurden, um alles Material auf dem Grund der Gefäße zu vereinen, ließ man sie drei Minuten in einem Wasserbad kochen. Danach wurden sie nochmals zwei Minuten zentrifugiert.

2.3.6. Auftragen der Proben

Aus dem vollständig polymerisierten Konzentrierungsgel wurde vorsichtig der Kunststoffkamm gezogen, so daß 14 Taschen zum Auftragen der Proben entstanden. Außerdem wurde die Plastelinmasse am unteren Ende der Glasplatten sorgfältig entfernt.

Danach wurden die Glasplatten mittels zweier Kunststoffschrauben in die Elektrophoresekammer eingespannt. Anschließend wurde soviel Elektrodenpuffer eingefüllt, daß beide Gelenden gut von Puffer bedeckt waren.

Dann wurden die Geltaschen gesäubert, indem man die Spitze einer Hamilton Mikrolitерspritze vorsichtig in den Taschen hin- und herbewegte, um Schlieren von unvollständig polymerisiertem Konzentrierungsgel zu entfernen.

Jetzt wurden die Proben mit Hilfe einer Hamilton Mikrolitерspritze vorsichtig aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, daß kein Material in benachbarte Taschen gelangte. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurde die Hamilton Spritze wenigstens 10 Mal mit Aqua bidest. gespült.

2.3.7. Elektrophorese

Unmittelbar nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophoresekammer an das Spannungsgerät angeschlossen. Die Elektrophorese dauerte 4 3/4 Stunden bei 200 V Spannung. Da der Puffer zur Probenbereitung mit Bromphenolblau angefärbt war, konnte während dieser Zeit die Wanderung der Lauffront verfolgt werden.

2.3.8. Färben und Entfärben des Gels

Nach dem Abschalten des Spannungsgerätes wurden die Glasplatten aus der Elektrophoresekammer genommen und durch vorsichtiges Spreizen mit einer Schere voneinander getrennt, wobei das Gel an einer der beiden Platten haften blieb. Das Gel wurde mit dem Finger vom Rande her von der Glasplatte abgelöst und sofort in eine Färbeschale mit 500 ml Färbelösung gegeben. Dort ließ man es 30 bis 60 Minuten liegen. Die Färbelösung konnte mehrmals verwendet werden. Nach der oben angegebenen Zeit wurde das Gel dann in eine Schale mit 1000 ml Entfärbelösung gegeben. Das Gel wurde über Nacht entfärbt, die gebrauchte Entfärbelösung anschließend weggeschüttet.

2.3.9. Fluorographie

Zunächst wurde das Volumen des Gels aus seiner Länge, Breite und Dicke errechnet. Dann wurde das Gel für 30 Minuten in 20 Volumina DMSO gelegt. Danach wurde das Gel nochmals für 30 Minuten in ein Bad aus 20 Volumina DMSO gegeben. Beide DMSO-Lösungen konnten getrennt aufbewahrt und unter Einhaltung der Reihenfolge mehrmals verwendet werden.

Nach der beschriebenen Vorbehandlung mit reinem DMSO wurde das Gel in 4 Volumina 20 % PPO in DMSO gelegt und verblieb darin drei Stunden; die Schale wurde mit Aluminiumfolie abgedeckt, um eine Zersetzung des PPO durch Licht zu vermeiden. Die 20 % Lösung von PPO in DMSO wurde nach einmaligem Gebrauch verworfen.

Zuletzt wurde das Gel für eine Stunde in ein Bad aus 20 Volumina H_2O gelegt.

Nach dem letzten Bad wurde das Gel solange mit Aqua bidest. abgespült, bis keine PPO-Flocken mehr darauf zu sehen waren und anschließend auf das mit zwei Filterpapieren bestückte, nasse Rost des Geltrockners gelegt. Dann wurde das Gel zunächst mit einer dicken Bucheinbandfolie, darüber mit einer feinen Cellophanfolie abgedeckt. Danach wurde es durch kombinierte Anwendung von Wärme und Vakuum in 1 1/2 bis 2 Stunden getrocknet.

Vom getrockneten Gel wurden die Folien abgezogen, und anschließend das Gel mit dem Filterpapier auf eine Bleiplatte geklebt. Dann wurde in einer Dunkelkammer bei Rotlicht der Röntgenfilm auf das Gel gelegt und dieser mit einer weiteren Bleiplatte beschwert um zu verhindern, daß er sich rollt. Zuletzt wurden die beiden Bleiplatten zum Schutz vor seit-

lich einfallendem Licht mehrfach mit Aluminiumfolie umwickelt und mit zwei Zugschrauben fest aneinandergepreßt.

Dann wurde die Dunkelkammer verlassen, der eingelegte Film zur Exposition in einen Gefrierschrank von -60°C gestellt. Die Expositionsdauer betrug je nach gemessener Radioaktivität der aufgetragenen Proben zwei bis acht Tage.

Nach beendeter Exposition wurde der Röntgenfilm wieder in einer Dunkelkammer entnommen und anschließend in einem Entwicklungsautomaten für Röntgenbilder entwickelt.

ÜBERSICHT ÜBER DIE METHODIK ZUR ISOLIERUNG VON MRNS
UND DEREN ZELLFREIE TRANSLATION IM MRNS-ABHÄNGIGEN
RETIKULOZYTEN-LYSAT-SYSTEM

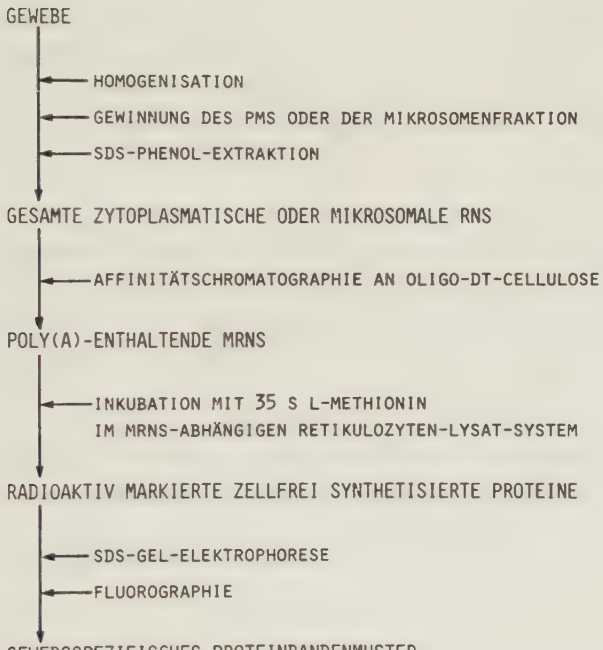


Abb.2: Übersicht über die Methodik zur Isolierung von mRNS und deren zellfreie Translation im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung von mRNS

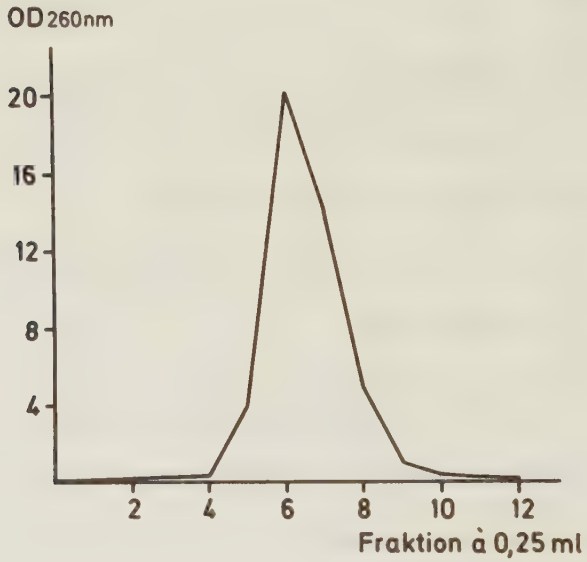


Abb.3: Affinitätschromatographie von mRNS (menschlicher Hoden) an Oligo-dT-Cellulose. Puffer 1 mM Hepes, pH 7,0.
Die optische Dichte (OD_{260nm}) der mRNS-Lösung (Ordinate) ist gegen die Fraktionen des Säuleneluats (Abszisse) aufgetragen.

Zur Berechnung der Ausbeuten an Gesamt-RNS und an mRNS:

Zur Berechnung des Gewichts von Gesamt-RNS und mRNS aus der optischen Dichte ihrer Lösungen (OD_{260nm}/ml) wurde diese mit dem Umrechnungsfaktor 40 multipliziert, um das Gewicht in µg zu erhalten (84).

Um die Gesamt-OD der mRNS bei der Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose zu erhalten, wurden die optischen Dichten (OD_{260nm}/0,25 ml) sämtlicher Fraktionen addiert und ihre Summe durch 4 dividiert.

Die RNS-Ausbeuten einzelner Aufarbeitungen wurden miteinander verglichen, indem diese auf das Gewebsgewicht in g bezogen wurden. Für die durchschnittliche Ausbeute an Gesamt-RNS und mRNS wurden jeweils die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet.

Zur Berechnung der Standardabweichung (s) und des Variationskoeffizienten (Vk) wurden folgende Formeln verwendet:

$$s = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}} \qquad Vk\ (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\ \%$$

Dabei sind:

x : Ergebnis einer Aufarbeitung
$\bar{x}$: Mittelwert aus den Ergebnissen mehrerer Aufarbeitungen
n : Anzahl der Aufarbeitungen

Ferner wurde für den Vergleich der Ergebnisse der Quotient aus mRNS und Gesamt-RNS als Prozentzahl angegeben.

3.1.1. Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden

Abb.3 zeigt ein typisches Elutionsprofil einer mRNS-Lösung aus menschlichem Hoden nach Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose.

In Tabelle 1 sind sowohl die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS/Gewebsgewicht (Ges.-RNS/Gg.) als auch an mRNS/Gg. sowie die Quotienten mRNS x 100/Ges.-RNS sämtlicher Aufarbeitungen aus menschlichem Hoden zusammengefaßt.

Tabelle 1: Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden - Ergebnisse der einzelnen Aufarbeitungen

n-te Aufarbeitung	1.	2.	3.	4.	5.	Einheit
Ges.-RNS/Gg.	637	601	609	597	502	µg/g
mRNS/Gg.	34,1	27,9	30,9	35,6	26,6	µg/g
$\frac{\text{mRNS x 100}}{\text{Ges.-RNS}}$	5,35	4,63	5,08	5,97	5,31	%

In Tabelle 2 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS/Gewebsgewicht und an mRNS/Gewebsgewicht zusammengestellt.

Tabelle 2: Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden - Statistische Auswertung der Ergebnisse

	Mittelwert (µg/g)	Standard-abweichung (µg/g)	Variations-koeffizient (%)
Ges.-RNS/Gg.	589	51,2	8,7
mRNS/Gg.	31,0	3,9	12,6

Für den Quotienten aus mRNS x 100/mikrosomale Ges.-RNS ergab sich ein Mittelwert von 5,27 %.

Bei einem mittleren Gewicht eines Hodens von 15,8 g errechnete sich unter Zuhilfenahme der oben aufgeführten Mittelwerte (s.Tab.2) die durchschnittliche Ausbeute an mikrosomaler Gesamt-RNS pro Hoden zu 9310 µg, die mittlere Ausbeute an mikrosomaler mRNS pro Hoden zu 490 µg.

3.1.2. Isolierung von mRNS aus menschlichem Hepatom

Das Elutionsprofil einer mRNS-Lösung aus menschlichem Hepatom nach Affinitätschromatographie an Oligo-dT-Cellulose entspricht in qualitativer Hinsicht Abb.3. Die optischen Dichten (OD_{260nm}) der Gipfelfraktionen liegen jedoch für die Isolierung von mRNS aus 5 bis 10 g menschlichem Hepatomgewebe wesentlich niedriger.

3.1.2.1. Isolierung von mRNS aus der Mikrosomenfraktion menschlichen Hepatoms

In Tabelle 3 sind sowohl die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS/Gewebsgewicht (Ges.-RNS/Gg.) als auch an mRNS/Gg. sowie die Quotienten mRNS x 100/Ges.-RNS aller Aufarbeitungen aus der Mikrosomenfraktion menschlichen Hepatoms zusammengestellt.

Tabelle 3: Isolierung von mRNS aus der Mikrosomenfraktion menschlichen Hepatoms - Ergebnisse der einzelnen Aufarbeitungen

n-te Aufarbeitung	1.	2.	3.	Einheit
Ges.-RNS/Gg.	470	512	525	µg/g
mRNS/Gg.	5,53	2,94	4,88	µg/g
$\frac{\text{mRNS x 100}}{\text{Ges.-RNS}}$	1,18	0,57	0,93	%

In Tabelle 4 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS/Gewebsgewicht und an mRNS/Gewebsgewicht zusammengestellt.

Tabelle 4: Isolierung von mRNS aus der Mikrosomenfraktion menschlichen Hepatoms - Statistische Auswertung der Ergebnisse

	Mittelwert (µg/g)	Standard-abweichung (µg/g)	Variations-koeffizient (%)
Ges.-RNS/Gg.	502	25,4	5,1
mRNS/Gg.	4,45	1,35	30,0

Für den Quotienten aus mRNS x 100/mikrosomale Ges.-RNS ergab sich ein Mittelwert von 0,89 %.

Bei einer durchschnittlichen Gewebsmenge von 6,1 g pro Aufarbeitung errechnete sich unter Zuhilfenahme der oben aufgeführten Mittelwerte (s.Tab.4) die mittlere Ausbeute an mikrosomaler Gesamt-RNS pro Aufarbeitung zu 3060 µg, die durchschnittliche Ausbeute an mikrosomaler mRNS pro Aufarbeitung zu 27,1 µg.

3.1.2.2. Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlichen Hepatoms

In Tabelle 5 sind sowohl die Ausbeuten an zytoplasmatischer Gesamt-RNS/Gewebsgewicht (Ges.-RNS/Gg.) als auch an mRNS/Gg. sowie die Quotienten mRNS x 100/Ges.-RNS aller Aufarbeitungen aus dem postmitochondrialen Überstand menschlichen Hepatoms zusammengefaßt.

Tabelle 5: Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlichen Hepatoms - Ergebnisse der einzelnen Aufarbeitungen

n-te Aufarbeitung	1.	2.	3.	4.	5.	Einheit
Ges.-RNS/Gg.	681	783	543	296	970	µg/g
mRNS/Gg.	7,04	4,99	4,81	3,87	8,50	µg/g
$\frac{\text{mRNS x 100}}{\text{Ges.-RNS}}$	1,03	0,64	0,89	1,31	0,88	%

In Tabelle 6 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die Ausbeuten an zytoplasmatischer Gesamt-RNS/Gewebsgewicht und an mRNS/Gewebsgewicht zusammengestellt.

Tabelle 6: Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlichen Hepatoms - Statistische Auswertung der Ergebnisse

	Mittelwert (µg/g)	Standard-abweichung (µg/g)	Variations-koeffizient (%)
Ges.-RNS/Gg.	655	254	38,8
mRNS/Gg.	5,84	1,88	32,2

Für den Quotienten aus mRNS x 100/zytoplasmatische Gesamt-RNS ergab sich ein Mittelwert von 0,95 %.

Bei einer durchschnittlichen Gewebsmenge von 6,7 g Hepatom pro Aufarbeitung errechnete sich unter Zuhilfenahme der oben aufgeführten Mittelwerte (s.Tab.6) die mittlere Ausbeute an zytoplasmatischer Gesamt-RNS pro Aufarbeitung zu 4390 µg, die durchschnittliche Ausbeute an zytoplasmatischer mRNS pro Aufarbeitung zu 39,1 µg.

3.1.3. Ergebnisse der Isolierung von mRNS aus den Referenzgeweben Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta

3.1.3.1. Isolierung von mRNS aus Rattenherz

In Tabelle 7 sind sowohl die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS/Gewebsgewicht (Ges.-RNS/Gg.) als auch an mRNS/Gg. sowie die Quotienten mRNS x 100/Ges.-RNS aller Aufarbeitungen aus der Mikrosomenfraktion von Rattenherzen zusammengestellt.

Tabelle 7: Isolierung von mRNS aus Rattenherz - Ergebnisse der einzelnen Aufarbeitungen

n-te Aufarbeitung	1.	2.	3.	Einheit
Ges.-RNS/Gg.	1052	857	923	µg/g
mRNS/Gg.	33,7	26,5	27,0	µg/g
$\frac{\text{mRNS x 100}}{\text{Ges.-RNS}}$	2,89	3,08	2,93	%

In Tabelle 8 sind die Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS/Herzgewicht und an mRNS/Herzgewicht zusammengestellt.

Tabelle 8: Isolierung von mRNS aus Rattenherz - Statistische Auswertung der Ergebnisse

	Mittelwert (µg/g)	Standard-abweichung (µg/g)	Variations-koeffizient (%)
Ges.-RNS/Gg.	944	99,2	10,5
mRNS/Gg.	29,1	4,02	13,8

Für den Quotienten aus mRNS x 100/mikrosomale Gesamt-RNS ergab sich ein Mittelwert von 2,97 %.

Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 4,4 g für 10 Rattenherzen errechnete sich unter Zuhilfenahme der oben aufgeführten Mittelwerte (s.Tab.8) die mittlere Ausbeute an mikrosomaler Gesamt-RNS pro Aufarbeitung zu 4150 µg, die durchschnittliche Ausbeute an mikrosomaler mRNS pro Aufarbeitung zu 128 µg.

3.1.3.2. Isolierung von mRNS aus Rattenleber

Zur Isolierung von mRNS aus der Mikrosomenfraktion von Rattenleber liegt nur eine Aufarbeitung vor. Tabelle 9 zeigt das Ergebnis dieser Aufarbeitung von 6 Lebern gefasteter Ratten.

Tabelle 9: Isolierung von mRNS aus Rattenleber

		Einheit
Ges.-RNS/Aufarbeitung	69420	µg
Ges.-RNS/Gg.	2700	µg/g
mRNS/Aufarbeitung	1420	µg
mRNS/Gg.	55,2	µg/g
mRNS x 100/Ges.-RNS	2,05	%

3.1.3.3. Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlicher Plazenta

Tabelle 10 zeigt das Ergebnis einer Aufarbeitung von 23,4 g plazentarem Zottengewebe, das von einer Schnittentbindung stammte. Es handelt sich hierbei entsprechend der Isolierung aus dem postmitochondrialen Überstand jeweils um die gesamte zytoplasmatische RNS bzw. mRNS (s. auch 3.1.2.2.).

Tabelle 10: Isolierung von mRNS aus dem postmitochondrialen Überstand menschlicher Plazenta

		Einheit
Ges.-RNS/Aufarbeitung	9470	µg
Ges.-RNS/Gg.	405	µg/g
mRNS/Aufarbeitung	126	µg
mRNS/Gg.	5,4	µg/g
mRNS x 100/Ges.-RNS	1,33	%

3.2. Zellfreie Translation

Die zellfreie Translation erfolgte stets in einem mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System wie in 2.2. beschrieben. In Tabelle 11 sind für sämtliche isolierte mRNS-Spezies die Inkorporationsraten von ^{35}S L-Methionin in das Gesamtprotein eines 1 µl Aliquots, das einem 25 µl Inkubationsansatz entnommen wurde, aufgeführt.

Tabelle 11: Zellfreie Translation - Inkorporationsraten von ^{35}S L-Methionin in das Gesamtprotein eines 1 µl Aliquots eines 25 µl Inkubationsansatzes

Gewebe	mRNS(µg)	extrahiert aus	Zpm^{+})	Zpm o. mRNS^{++})
Hoden	1,0	Mikrosomen	84220	18710
Hepatom	0,25	Mikrosomen	24778	15199
Hepatom	0,25	PMS	56788	15199
Rattenherz	0,50	Mikrosomen	48907	15199
Rattenleber	0,50	Mikrosomen	49599	15199
Plazenta	0,75	PMS	38440	18710

+) Zpm = Zählrate pro Minute einer Inkubation mit der angegebenen mRNS-Menge

++) Zpm o. mRNS = Zählrate pro Minute einer Inkubation ohne mRNS (Kontrolle)

3.3. Elektrophorese und Fluorographie

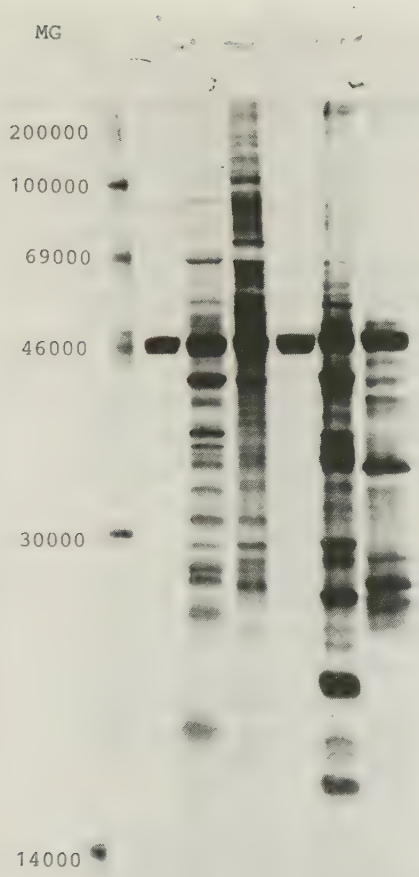
Die gefärbten Gele zeigten in allen Läufen von Retikulozyten-Lysat-Inkubat dieselben Banden ribosomaler Proteine.

Die Banden zellfrei synthetisierter Proteine wurden durch die Fluorographie sichtbar gemacht.

In sämtlichen Gelen wurden ^{14}C-markierte Proteine (Myosin H, MG 200000; Phosphorylase b, MG 100000 u. 92500; bovines Serumalbumin, MG 69000; Ovalbumin, MG 46000; Carboanhydrase, MG 30000; Lysozym, MG 14000), SA 8 - 36 µCi/mg als Standard mitgeführt. Darüber hinaus enthielt jedes Gel einen Lauf aus Inkubat ohne mRNS.

Jeder Lauf aus inkubiertem Retikulozyten-Lysat-System zeigte eine Proteinbande, die einem Molekulargewicht von 49000 zuzuordnen war; dieses Protein wurde auch in Abwesenheit exogener mRNS synthetisiert.

Abbildung 4 zeigt typische Läufe zellfrei synthetisierter Proteine von mRNS aus menschlichem hepatozellulärem Karzinom (PMS), menschlichem Hoden, humaner Plazenta, Rattenherz und Rattenleber. Die aufgetragenen Proben enthielten die in Tabelle 11 genannten Mengen inkorporierter Radioaktivität.



(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)

Abb.4: Fluorographische Darstellung zellfrei synthetisierter Proteine.
(1) ^{14}C-markierte Standardproteine (s.S.60), (2) Inkubation ohne mRNS, (3) menschliches hepatozelluläres Karzinom (PMS), (4) menschlicher Hoden, (5) humane Plazenta, (6) Rattenherz, (7) Rattenleber.

4. DISKUSSION

4.1. Allgemeine Gesichtspunkte zur Isolierung von mRNS

Untersuchungen an verschiedenen Organen zeigten, daß ribosomale RNS (= rRNS) oft stark an mRNS gebunden ist (35,76,77). So kann die rRNS im Einzelfall einen Anteil von bis zu 50 % an der gesamten, an Oligo-dT-Cellulose gebundenen RNS (der sogenannten mRNS) haben. Efstratiadis (23) machte dafür die Tatsache verantwortlich, daß 18 S rRNS und verschiedene mRNS-Moleküle komplementäre Sequenzen von 3 - 7 Basenpaaren aufweisen. Zähringer bestimmte den Anteil kontaminierender rRNS, indem er aus Rattenherzen isolierte mRNS einer mehrfachen Passage über Oligo-dT-Cellulose unterzog; der von ihm gefundene Wert lag bei 13,4 % (84).

Ein gewisser Anteil kontaminierender rRNS ist auch für die aus menschlichem Hoden und menschlichem hepatozellulärem Karzinom isolierte mRNS zu erwarten. Dieser Anteil wurde jedoch nicht bestimmt. Eine derartige Bestimmung wäre außerdem für die mRNS aus humanem hepatozellulärem Karzinom technisch kaum durchführbar, da die pro Aufarbeitung erhaltene Menge an mRNS sehr niedrig ist (s. 3.1.2.).

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß die an die mRNS gebundene rRNS die Aktivität der mRNS bei der zellfreien Translation zu steigern vermag (35).

Anhand von Hybridisierungsexperimenten myokardialer mRNS an ^{3}H Poly(U) konnte Zähringer zeigen, daß von der tatsächlich im Rattenherzgewebe vorhandenen mRNS nur etwa 40 - 50 % extrahiert werden können (85). Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, während verschiedener Isolierungsschritte von myokardialer mRNS aus Rattenherzen in kleinen Aliquots den

jeweiligen mRNS-Gehalt zu bestimmen. Dadurch gelang es zu zeigen, daß der Verlust an mRNS bei den ersten beiden Aufarbeitungsschritten (Gewinnung des postmitochondrialen Überstandes durch Abzentrifugieren der Zellkerne, Myofibrillen und Mitochondrien; Gewinnung mikrosomaler Pellets durch Abtrennung des postmikrosomalen Überstandes) teilweise durch Abzentrifugieren subzellulärer Partikel mit der darin enthaltenen RNS bedingt ist. Bei sämtlichen weiteren Schritten wird der Verlust an mRNS ausschließlich durch den jeweiligen Isolierungsvorgang selbst verursacht.

Unter dem gerade beschriebenen Aspekt sind auch die eigenen Ausbeuten an mRNS für menschlichen Hoden, humanes Hepatom, Rattenherz, Rattenleber und menschliche Plazenta zu sehen. Wie hoch der Anteil der extrahierten mRNS an der tatsächlich im Gewebe vorhandenen mRNS ist, wurde nicht bestimmt. Da die von Zähringer zur Isolierung von mRNS aus Rattenherzen beschriebene Methode (84) jedoch in vielen wesentlichen Schritten mit den eigenen verwendeten Methoden übereinstimmt, ist davon auszugehen, daß die Verhältnisse für die mRNS-Ausbeuten eigener Aufarbeitungen ähnlich liegen wie oben beschrieben.

4.2. Spezielle Gesichtspunkte zur Isolierung von mRNS aus den verschiedenen Geweben

4.2.1. Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden

Für die Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS und an mRNS aus menschlichem Hoden ließ sich aufgrund der geringen Patientenzahl (die Hoden der Aufarbeitungen 1 und 2 sowie 3 und 4 stammten jeweils vom gleichen Patienten) keine eindeutige Altersabhängigkeit nachweisen. Darüber hinaus bleibt offen, welchen Einfluß die Grundkrankheit der Patienten (metastasierendes Prostatakarzinom) auf die Proteinsynthese und damit den Gehalt an Gesamt-RNS und mRNS im menschlichen Hoden nimmt.

Die mittlere aus menschlichem Hoden extrahierbare Quantität an mRNS lag mit 31,0 µg pro Gramm Gewebe sehr hoch; sie übertraf damit noch die in eigenen Aufarbeitungen aus Rattenherzen isolierte durchschnittliche mRNS-Menge (29,1 µg/g).

Die durchschnittliche aus menschlichem Hoden isolierte Quantität an mikrosomaler Gesamt-RNS lag jedoch mit 589 µg pro Gramm Gewebe deutlich niedriger als die in eigenen Aufarbeitungen aus Rattenherzen erhaltene (944 µg/g).

Daraus läßt sich unmittelbar ableiten, daß der Quotient aus mRNS x 100/mikrosomale Gesamt-RNS für menschlichen Hoden (5,27 %) wesentlich höher lag als für Rattenherzen (2,97 %). Dieses Ergebnis läßt sich zum einen dahingehend interpretieren, daß die Mikrosomenfraktion des menschlichen Hodens durch einen besonders hohen Anteil an mRNS charakterisiert ist. Andererseits aber könnte aufgrund komplementärer Sequenzen zwischen rRNS und mRNS der Anteil kontaminierender rRNS an der mRNS besonders hoch sein (s. 4.1.).

Die Isolierung von mRNS menschlicher Hoden war besser reproduzierbar als die anderer Gewebe. In fünf Aufarbeitungen aus menschlichem Hoden lag der Variationskoeffizient als Maß für die Streuung der Einzelergebnisse für die mikrosomale Gesamt-RNS/Gewebsgewicht bei nur 8,7 %, für die mikrosomale mRNS/Gewebsgewicht bei nur 12,6 %. In drei Aufarbeitungen aus Rattenherzen lag der Variationskoeffizient zum Vergleich für mikrosomale Gesamt-RNS/Gewebsgewicht bei 10,5 %, für mikrosomale mRNS/Gewebsgewicht bei 13,8 %.

4.2.2. Isolierung von mRNS aus menschlichem Hepatom

Die Isolierung funktionell intakter mRNS aus menschlichem Hepatomgewebe gelang erst durch Modifikation der Aufarbeitung, wie sie für Rattenleber beschrieben war (80).

Entsprechend der Empfehlung von Sala-Trepat et al. (67) wurde besonderer Wert darauf gelegt, nekrotisches Tumorgewebe möglichst vollständig zu exzidieren. Dies gelang jedoch nur mit Einschränkung, da intaktes Tumorgewebe häufig von multiplen, zum Teil sehr kleinen Nekrosen durchsetzt war und sich außerdem oft sehr schwer von hämorrhagisch verfärbten, nekrotischen Anteilen abgrenzen ließ. Nicht zuletzt wegen der begrenzten Verfügbarkeit des Tumorgewebes war es unmöglich, sämtliches nekrotisches Material vollständig auszuschneiden.

Wird nekrotisches Gewebe mitverarbeitet, müssen vor allem zwei Nachteile in Kauf genommen werden. Erstens sind Nekrosen reich an nackter (d.h. nicht durch eine Kernmembran geschützter) DNS, welche im postmitochondrialen Überstand (PMS) und in der Gesamt-RNS-Lösung erscheint und schließlich als Kontamination der mRNS deren zellfreie Translation inhibiert. Ein wichtiger Hinweis auf eine DNS-Kontamination besteht in einer deutlichen Trübung der mit DNS kontaminierten Gesamt-RNS-Lösung, wohingegen Gesamt-RNS-Lösung ohne eine derartige Verunreinigung wasserklar aussieht. Die DNS-Kontamination kann durch zweimaliges Waschen der Gesamt-RNS mit 3 M Natriumacetat-Lösung von pH 6,0 (s. 2.1.2.5.4. bzw. 2.1.1.5.3.) beseitigt werden, wobei durch dieses Vorgehen außerdem tRNS, 5 S rRNS, Glykogen und Heparin entfernt werden, die ebenfalls inhibitorisches Material der zellfreien Translation darstellen (76).

Zweitens sind Nekrosen reich an aktivierten, durch die defekten Lysosomenmembranen austretenden Ribonukleasen, welche die mRNS degradieren können. Es kommt hinzu, daß für humanes Hepatomgewebe in Analogie zum Hepatokarzinom der Ratte (53) an sich schon eine hohe Aktivität an endogener Ribonuklease zu erwarten ist. Deshalb wurde zusätzlich zur Verwendung von Heparin als effektivem Ribonukleaseinhibitor (76) EDTA in einer Konzentration von 0,5 mM dem Homogenisierungspuffer zugefügt, welches mit Ca^{2+}, einem Cofaktor der Ribonukleasen, Chelate bildet. Die Verwendung von EDTA in dieser Konzentration hatte sich bereits bei der Isolierung von Polysomen und mRNS aus menschlicher Plazenta, einem ebenfalls sehr Ribonuklease-reichen Gewebe, bewährt (10,11,38).

Die Verwendung des sonst routinemäßig in den Homogenisierungspuffer zugegebenen Heparins ist bei der Isolierung von mRNS aus Tumorgewebe nicht unproblematisch, da Heparin in der üblichen verwendeten Konzentration die Membranen der großen Tumorzellkerne zu lysieren vermag. Um diesen Nachteil zu verhindern, setzte Wall (77) dem Homogenisierungspuffer zusätzlich Spermidinsulfat zu. Auf einen derartigen Zusatz wurde bei der Isolierung von mRNS aus humanem hepatozellulärem Karzinom verzichtet; jedoch wurde auf besonders schonende Homogenisierungsbedingungen (Verwendung eines locker in den Glaskolben passenden Teflonstabes; niedrige Drehzahl pro Minute des Potter Elvehjem Homogenisators) geachtet. Um eine Lysis der Zellkerne zu vermeiden, wurde dem Homogenisierungspuffer auch kein Detergens wie Triton-X-100 zugesetzt, das bei der Isolierung aus Rattenherzen die Ausbeuten an mRNS zu steigern vermag (84).

Isolierte man mRNS aus dem PMS, so fand sich eine wesentlich höhere Translationsaktivität (meßbar an den Inkorporationsraten von ^{35}S L-Methionin in das Gesamtprotein eines 1 µl

Aliquots eines 25 µl Inkubationsansatzes) als für mRNS aus der Mikrosomenfraktion (s. 3.2., Tab. 11). Diese Tatsache legt nahe, daß die mRNS während der 70 Minuten dauernden Zentrifugation zur Abtrennung der Mikrosomenfraktion teilweise degradiert wurde. Daher bewährte sich für menschliches Hepatomgewebe die Isolierung von mRNS direkt aus dem PMS gleichermaßen wie für die ebenfalls an Ribonuklease-Aktivität reiche humane Plazenta (10).

Entsprechend der Tatsache, daß der PMS sowohl die mikrosomale wie auch die postmikrosomale Fraktion beinhaltet, war zu erwarten, daß die erhaltene Menge an mRNS bzw. Gesamt-RNS für Isolierungen aus dem PMS höher als für solche aus der Mikrosomenfraktion lag. Tatsächlich lag die extrahierte Menge an Gesamt-RNS bzw. mRNS für Aufarbeitungen aus dem PMS (mittlere Ausbeute an Gesamt-RNS/Gewebsgewicht 655 µg/g; an mRNS/Gewebsgewicht 5,84 µg/g) im Durchschnitt um 28,5 % (Gesamt-RNS) bzw. 31,2 % (mRNS) höher als für Aufarbeitungen aus der Mikrosomenfraktion (mittlere Ausbeute an Gesamt-RNS/Gewebsgewicht 502 µg/g; an mRNS/Gewebsgewicht 4,45 µg/g). Dieser Unterschied ist zum einen durch den Inhalt der postmikrosomalen Fraktion begründet, zum anderen mag er durch Verluste bei der Weiterverarbeitung des PMS zur Mikrosomenfraktion erklärt sein (s. 4.1.).

Die mRNS-Ausbeute für das menschliche hepatozelluläre Karzinom war mit 4,45 µg/g (mRNS/Gewebsgewicht aus der Mikrosomenfraktion) wesentlich niedriger als für menschlichen Hoden (31,0 µg/g), Rattenleber (55,2 µg/g) und Rattenherz (29,1 µg/g). Da die Isolierungsbedingungen für die mRNS aus humanem Hepatom einerseits und aus menschlichem Hoden, Rattenleber und Rattenherz andererseits prinzipiell übereinstimmen, lassen sich die erheblichen Unterschiede in den mRNS-Ausbeuten durch die Annahme einer unterschiedlichen

Effizienz bei der Präparation kaum hinreichend erklären. Eher ist anzunehmen, daß die Zellen des hepatozellulären Karzinoms eine relativ niedrige Konzentration an mRNS enthalten, die aber - sofern die Translation in vitro auf das Proteinsyntheseverhalten in vivo rückschließen läßt - eine hohe proteinsynthetisierende Aktivität besitzt (s. 3.2.).

Auffallend war, daß die aus dem PMS des hepatozellulären Karzinoms extrahierbare mRNS-Menge mit 5,84 µg/g dem für menschliche Plazenta erhaltenen Wert (5,40 µg/g) sehr ähnlich war. Auch die Quotienten aus mRNS x 100/Gesamt-RNS als Maß für den Anteil der mRNS an der gesamten zytoplasmatischen RNS lagen für das menschliche Hepatom (0,95 %) und für die humane Plazenta (1,33 %) nahe beieinander. Diese übereinstimmenden Daten sind möglicherweise ein Hinweis auf ein ähnliches quantitatives Proteinsyntheseverhalten im menschlichen Hepatom und der humanen Plazenta.

Die Streuung der Einzelergebnisse war für das menschliche Hepatom wesentlich größer als für den humanen Hoden. So betrug der Variationskoeffizient bei Isolierungen aus dem PMS menschlichen Hepatoms für die Gesamt-RNS/Gewebsgewicht 38,8 % und für die mRNS/Gewebsgewicht 32,2 %, bei Isolierungen aus der Mikrosomenfraktion für die Gesamt-RNS/Gewebsgewicht 5,1 % und für die mRNS/Gewebsgewicht 30,0 %. Diese zum Teil relativ große Streubreite mag in der Inhomogenität des Gewebes, die in der Polymorphie der Tumorzellen ihr entsprechendes Korrelat hat, begründet sein. Darüber hinaus hat sicher der variable Anteil devitalen Tumorgewebes einen Einfluß auf die Unterschiede in den Ausbeuten der einzelnen Aufarbeitungen. Zum Vergleich soll jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß Zähringer nach sorgfältiger Standardisierung der Isolierungsbedingungen in neun Präparationen von mRNS aus Rattenherzen - einem Normalgewebe - bei einem Mittelwert von

20,4 µg mRNS pro Gramm Gewebe bereits eine Standardabweichung von 5,9 µg/g (entsprechend einem Variationskoeffizienten von 28,9 %) erhielt. Dieser Wert kommt den Variationskoeffizienten der für das menschliche Hepatom erhaltenen Quantität an mRNS aber schon sehr nahe.

4.2.3. Isolierung von mRNS aus den Referenzgeweben Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta

Zur Isolierung von mRNS aus Rattenherzen wurde die Methode von Zähringer (84) übernommen. Vergleicht man die publizierten mit den eigenen Ergebnissen, so zeigt sich eine Übereinstimmung hinsichtlich des Anteils der mRNS an der mikrosomalen Gesamt-RNS. So kam der aus den Ergebnissen von drei eigenen Aufarbeitungen errechnete Quotient aus mRNS x 100/mikrosomale Gesamt-RNS mit 2,97 % sehr nahe an den von Zähringer in neun Präparationen gefundenen Durchschnittswert von 2,84 % heran (84). Die eigenen Ausbeuten an mikrosomaler Gesamt-RNS (944 $\pm$ 99 µg/g) und mikrosomaler mRNS (29,1 $\pm$ 4,0 µg/g) waren den entsprechenden Werten von Zähringer (mikrosomale Gesamt-RNS 719 $\pm$ 70 µg/g (84) bzw. 759 $\pm$ 181 µg/g (86); mikrosomale mRNS 20,4 $\pm$ 5,9 µg/g (84) bzw. 24,7 $\pm$ 2,0 µg/g (86)) ähnlich.

Durch Hybridisierung von mRNS an ^{3}H Poly(U) (s. auch 4.1.) konnte Zähringer in 19 Experimenten die aus der myokardialen Mikrosomenfraktion extrahierbare Menge an mRNS zu 27 $\pm$ 6 µg/g bestimmen (87) - ein Befund, der mit den eigenen Ergebnissen sehr gut in Einklang steht.

Ein quantitativer Vergleich war für die Präparation aus Rattenleber nicht möglich, da die betreffenden Arbeiten (79,80) keine Angaben über auf Gewebsgewicht bezogene Ausbeuten an Gesamt-RNS bzw. mRNS enthielten.

Dagegen konnte ein solcher Vergleich für die Isolierungen von mRNS aus menschlicher Plazenta angestellt werden. In einer eigenen Präparation aus Plazenta, die wie in sämtlichen Experimenten von Boime von einer Schnittentbindung stammte, wurden 405 µg/g zytoplasmatische Gesamt-RNS/Gewebsgewicht und 5,40 µg/g zytoplasmatische mRNS/Gewebsgewicht erhalten. Da-

raus errechnete sich der Quotient aus mRNS x 100/zytoplasmatische Gesamt-RNS zu 1,33 %. Im Vergleich dazu erhielt Boime in seinen Aufarbeitungen 250 bis 400 µg zytoplasmatische Gesamt-RNS pro Gramm Gewebe, der Quotient aus mRNS x 100/ zytoplasmatische Gesamt-RNS lag zwischen 1 und 2 % (11).

4.3. In-vitro Translation von mRNS in einem mRNS-abhängigen zellfreien System

Als Parameter für die funktionelle Integrität von mRNS-Präparationen gilt deren proteinsynthetisierende Aktivität in einem zellfreien System (85).

Zur in-vitro Translation von mRNS stand grundsätzlich eine Vielzahl zellfreier Systeme zur Auswahl. Die bedeutendsten unter ihnen wurden in einer Übersicht bei Taylor (76) aufgeführt. Zu diesen zählen das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-System (42,61) und das Weizenkeimsystem (45,46,65). Danach sind das Krebs-II-Maus-Aszites-System (47) sowie das Xenopus-laevis-Oozyten-System (27) zu nennen.

Neben dem zur Translation eigener mRNS-Präparationen ausschließlich verwendeten Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-System erlangte das Weizenkeimsystem die größte Bedeutung. Als wesentliche Vorzüge des Weizenkeimsystems stellte Taylor (76) seine einfache und billige Herstellung, seine unkomplizierte Handhabung sowie seinen relativ niedrigen endogenen mRNS-Gehalt heraus. Demgegenüber führte er als Nachteil an, daß verschiedene Präparationen dieses Systems sich in ihren proteinsynthetisierenden Aktivitäten in der Regel deutlich voneinander unterscheiden. Als weiteren Nachteil des Weizenkeimsystems nannte Taylor, daß in diesem System verschiedene mRNS-Moleküle konzentrationsabhängige Unterschiede bezüglich ihrer Peptidinitiationsraten zeigen, wodurch es zur kompetitiven mRNS-Translation kommt. Überdies stellte er als nachteilig heraus, daß jede einzelne mRNS-Spezies ihre individuellen Bedingungen für eine optimale Translation in diesem System erfordert. Als weiteren entscheidenden Nachteil bezeichnete er, daß suboptimale Bedingungen mit der Freisetzung unvollständiger Peptidketten in Form von Peptidyl-

tRNS beantwortet werden; diese Eigenschaft des Weizenkeimsystems berührt vor allem langkettige mRNS-Moleküle.

Wegen dieser Nachteile des Weizenkeimsystems wurde für die Translation eigener mRNS-Präparationen dem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat-System der Vorzug gegeben. Ein entscheidender Nachteil des ursprünglichen Retikulozyten-Lysat-Systems war sein hoher endogener Gehalt an Hämoglobin-mRNS. Pelham und Jackson (61) lösten dieses Problem, indem sie das System mit Ribonuklease aus Mikrokokken vorbehandelten, wodurch es mRNS-abhängig wurde.

Ein derart bereitetes Retikulozyten-Lysat-System eignete sich in hervorragender Weise zur in-vitro-Translation in eigenen Präparationen isolierter mRNS aus humanem Hoden, menschlichem hepatozellulärem Karzinom, Rattenherz, Rattenleber und humaner Plazenta. Wie aus Tabelle 11 zu ersehen ist, waren die Inkorporationsraten von ^{35}S L-Methionin in das Gesamtprotein eines 1 µl Aliquots eines 25 µl Inkubationsansatzes nach Zugabe heterologer mRNS stets signifikant höher als in entsprechenden Vergleichsansätzen ohne mRNS. Die Tatsache, daß bereits geringe Mengen an mRNS bis herab zu 0,25 µg genügten, um eine hohe Inkorporationsaktivität zu erzeugen, weist auf eine hohe Empfindlichkeit und Effizienz des Retikulozyten-Lysat-Systems hin. Wie in Abbildung 4 aus dem Proteinbandenmuster einer Inkubation von aus menschlichem Hoden isolierter mRNS zu ersehen ist, war das Retikulozyten-Lysat-System auch gut geeignet, langkettige mRNS-Moleküle in ihre entsprechenden hochmolekularen Proteine zu übersetzen. Im Lauf 4 dieser Fluorographie sind zahlreiche Banden zu erkennen, denen Proteine mit einem Molekulargewicht über 46000 (MG des Standardproteins Ovalbumin in Lauf 1) zuzuordnen sind. Aus der gleichen Abbildung ist ersichtlich, daß im Retikulozyten-Lysat-System in Abwesenheit exogener, heterologer mRNS (Lauf 2) im wesentlichen nur ein Protein mit einem Molekulargewicht von 49000 synthetisiert wird.

4.4. Elektrophorese und Fluorographie

Die zellfreie Translation im Retikulozyten-Lysat-System verbunden mit einer Messung der ^{35}S L-Methionin Inkorporation in das neusynthetisierte Gesamtprotein zeigte die funktionelle Intaktheit der aus menschlichem Hoden, humanem hepatozellulärem Karzinom, Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta isolierten mRNS-Präparationen. Durch elektrophoretische Auftrennung und anschließende Fluorographie wurde dann das die jeweiligen Gewebe kennzeichnende Proteinbandenmuster erstellt.

Die Abbildung 4 erlaubt einen Vergleich der bislang unbekannten Proteinbandenmuster für menschlichen Hoden und humanes hepatozelluläres Karzinom mit den bekannten Mustern für humane Plazenta, Rattenherz und Rattenleber.

Da in sämtlichen Gelen Standardproteine von bekanntem Molekulargewicht mitliefen, war es möglich, aus dem Molekulargewicht und dem Logarithmus der Laufstrecke eines Standardproteins sowie dem Logarithmus der Laufstrecke des gesuchten, unbekannten Proteins dessen Molekulargewicht mit Hilfe eines einfachen Dreisatzes zu errechnen. Auf diese Weise gelang es, zwei Proteinen in Lauf 3 die Molekulargewichte 43000 bzw. 68000 zuzuordnen. Möglicherweise handelt es sich dabei um die vom humanem Hepatom synthetisierten Tumormarkerproteine TPA (= Tissue Polypeptide Antigen) bzw. AFP (Alpha-Fetoprotein). Erhärtet wird dieser Verdacht dadurch, daß beide Tumormarker mit Hilfe radioimmunologischer Methoden sowohl mehrfach im Serum der Patientin als auch im postmikrosomalen Überstand des Gewebshomogenats nachgewiesen werden konnten (39); außer TPA (74) und AFP (20) wurde auch ein hoher Spiegel des Tumormarkers Ferritin (36,57) gefunden. Ein sicherer Nachweis der Biosynthese dieser Tumormarkerproteine könnte

durch eine hochempfindliche Immunpräzipitation mit geeigneten Antikörpern geführt werden, die bisher noch nicht gelang. Ein Problem dieser Methode liegt in dem nicht exakt bestimmbaren Anteil des zellfreien Inkubats an dem betreffenden nachzuweisenden Protein. Dadurch ist es erschwert, ein für eine ausreichende Präzipitation geeignetes Antigen-Antikörper-Verhältnis zu finden. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß die zellfreie Translation Vorstufen von Proteinen liefert, die in vivo nicht erscheinen, da sie in der Zelle sofort posttranslationären Modifikationsprozessen unterzogen werden (s. 1.1.3.). So erklärt sich, daß zellfrei synthetisierte Proteine sich in entscheidenden antigenen Determinanten von den zugehörigen in vivo vorkommenden zu unterscheiden vermögen; dadurch ergibt sich eine unterschiedliche Antikörper-Bindung der zellfrei synthetisierten Vorstufen gegenüber den in vivo vorkommenden fertigen Proteinen.

4.5. Bedeutung und Anwendung der Ergebnisse

Während des letzten Jahrzehnts ist unser Wissen über molekulargenetische Vorgänge beträchtlich angewachsen. So wird die Isolierung von mRNS aus zahlreichen tierischen Geweben und deren zellfreie Translation heute schon nahezu routinemäßig durchgeführt (s. 1.2.).

Wie alle in Tierexperimenten gewonnenen Einsichten sind auch auf derartige Weise erhaltene molekulargenetische Erkenntnisse vermutlich nur mit Vorbehalt und Einschränkung auf den Menschen anwendbar.

Für menschliche Gewebe liegen jedoch mit Ausnahme der Plazenta (10,11,38) kaum molekulargenetische Daten vor. In dieser Arbeit wurden deshalb geeignete Methoden zur Isolierung von mRNS aus menschlichem Hoden, einem "Normalgewebe", und aus humanem Hepatom, einem neoplastischen Gewebe, beschrieben.

Die isolierten funktionell intakten mRNS-Präparationen könnten in zukünftigen Experimenten als Ausgangsmaterial für die Darstellung spezifischer mRNS und die Synthese von cDNS (= complementäre DNS) dienen.

Die Einführung molekulargenetischer Methoden könnte in Zukunft zu einem grundlegend neuen Verständnis metabolischer und endokrinologischer Funktionen des menschlichen Hodens führen. Falls es gelingt, funktionell intakte mRNS in ausreichender Quantität aus Gewebsmaterial von Biopsien und Autopsien zu isolieren, könnten die zugrundeliegenden molekularen Vorgänge einiger genetischer Störungen sowie dystrophischer und neoplastischer Prozesse des menschlichen Hodens möglicherweise aufgeklärt werden.

Grundlegend neue Erkenntnisse sind auch von der Anwendung molekulargenetischer Methoden auf humane maligne Tumoren zu erwarten. Die Verwendung von direkt nach der operativen Entnahme tiefgefrorenem Gewebe könnte dabei von entscheidendem Vorteil gegenüber dem Gebrauch von Tumorzellkulturen oder von heterotransplantierten Tumoren menschlichen Ursprungs sein; bei letzteren sind nämlich Änderungen der Genexpression sowohl während der Präparation als auch während des Heranwachsens neuer Tumorzellen nie völlig auszuschließen.

So wird es mit Hilfe der aus humanem hepatozellulärem Karzinom isolierten mRNS und deren zellfreien Translation möglich sein, die Biosynthese von Tumormarkern, welche beim primären Leberzellkarzinom sowohl als diagnostischer Parameter als auch zur Kontrolle von Therapie und Krankheitsverlauf Bedeutung erlangt haben, zu studieren (s. 4.4.).

Generell könnte eine breite Anwendung molekulargenetischer Methoden unsere Kenntnisse von malignen Tumoren des Menschen auf eine umfassende neue Grundlage stellen. So könnte die Molekulargenetik dazu beitragen, die genaue Wirkungsweise zytostatischer Chemotherapie sowie hormoneller und immunologischer Tumortherapie auf molekularer Ebene aufzuklären. Darüber hinaus könnte die Molekulargenetik auch die Voraussetzungen für möglicherweise völlig neue Konzepte in der internistischen Tumortherapie schaffen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Geeignete Methoden zur Isolierung von mRNS aus menschlichem Normalgewebe (Hoden) und aus humanem neoplastischen Gewebe (hepatozelluläres Karzinom) werden beschrieben. Aus einem Gramm Hodengewebe konnte im Durchschnitt die hohe Ausbeute von 31,0 µg mikrosomaler mRNS extrahiert werden, aus einem Gramm Hepatom dagegen eine mittlere Ausbeute von 5,84 µg an gesamter zytoplasmatischer mRNS. Die funktionelle Intaktheit der isolierten mRNS-Präparationen wurde durch zellfreie Translation in einem mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System nachgewiesen, indem die Inkorporation von ^{35}S L-Methionin in das synthetisierte Gesamtprotein gemessen wurde. Die zellfrei synthetisierten Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch nachfolgende Fluorographie sichtbar gemacht.

Zum Vergleich mit den eigenen Ergebnissen wurde mit Hilfe in der Literatur beschriebener Standardverfahren mRNS aus Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta isoliert. Die in diesen Vergleichsaufarbeitungen pro Gramm Gewebe erhaltenen Mengen an mRNS bzw. Gesamt-RNS wurden einerseits mit den Angaben in der Literatur verglichen, andererseits den Ausbeuten für menschlichen Hoden und humanes hepatozelluläres Karzinom gegenübergestellt.

Sowohl die mRNS aus menschlichem Hoden und hepatozellulärem Karzinom als auch die mRNS aus Rattenherz, Rattenleber und menschlicher Plazenta zeigte eine ausgezeichnete proteinsynthetisierende Aktivität bei der Inkubation im mRNS-abhängigen Retikulozyten-Lysat-System als Beweis für ihre funktionelle Integrität.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abelson,J.
RNA processing and the intervening sequence problem.
Ann. Rev. Biochem. 48, 1035 - 1069 (1979)

2. Anderson,W., Bosch,L., Gros,F., Grunberg-Manago,M., Ochoa,S., Rich,A. and Staehelin,Th.
Initiation of protein synthesis in prokaryotic and eukaryotic systems.
FEBS Letters 48, 1 - 6 (1974)

3. Aviv,H. and Leder,Ph.
Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1408 - 1412 (1972)

4. Bag,J. and Sarkar,S.
Cytoplasmic nonpolysomal mRNP containing actin mRNA in chicken embryonic muscles.
Biochemistry 14, 3800 - 3807 (1975)

5. Baliga,B., Pronczuk,A. and Munro,H.
Regulation of polysome aggregation in a cell-free system through amino acid supply.
J. Mol. Biol. 34, 199 - 218 (1968)

6. Baliga,B., Zähringer,J., Trachtenberg,M., Moskowitz,M. and Munro,H.
Mechanism of D-Amphetamine inhibition of protein synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 442, 239 - 250 (1976)

7. Bantle,J. and Hahn,W.
Complexity and characterization of polyadenylated RNA in the mouse brain.
Cell 8, 139 - 150 (1976)

8. Belanger,L., Commer,P. and Chiu,J.
Isolation of rat alpha-fetoprotein messenger RNA from Morris Hepatoma 7777.
Cancer Research 39, 2141 - 2148 (1979)

9. Blobel,G. and Potter,V.
Studies on free and membrane-bound ribosomes in rat liver.
J. Mol. Biol. 26, 279 - 292 and 26, 293 - 301 (1967)

10. Boime,I., Boguslawski,S. and Caine,J.
The translation of human placental lactogen mRNA fraction in heterologous cell-free-systems: the synthesis of a possible precursor.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 103 - 109 (1975)

11. Boime,I., Mc Williams,D., Szczesna,E. and Camel,M.
Synthesis of human placental lactogen messenger RNA as a function of gestation.
J. Biol. Chem. 251, 820 - 825 (1976)

12. Bonner,W. and Laskey,R.
A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83 - 88 (1974)

13. Brawerman,G.
Eukaryotic messenger RNA.
Ann. Rev. Biochem., 621 - 642 (1974)

14. Campbell,P. and Blobel,G.
The role of organelles in the chemical modification of the primary translation products of secretory proteins.
FEBS Letters 72, 215 - 226 (1976)

15. Caskey,C.
Peptide chain termination.
Trends in Biochemical Sciences (TIBS), 234 - 237 (1980)

16. Chambon,P.
Eukaryotic nuclear RNA polymerases.
Ann. Rev. Biochem., 613 - 638 (1975)

17. Chan,S., Keim,P. and Steiner,D.
Cell-free synthesis of rat preproinsulins: Characterization and partial amino acid sequence determination.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 1964 - 1968 (1976)

18. Chiu,S., Gabryelak,T., Commers,P. and Massari,R.
The elevation of α-fetoprotein messenger RNA in regenerating rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 250 - 254 (1981)

19. Civelli,O., Vincent,A., Maundrell,K., Buri,J. and Scherrer,K.
The translational repression of globin mRNA in free cytoplasmic ribonucleoprotein complexes.
Eur. J. Biochem. 107, 577 - 585 (1980)

20. Cox,R. and Gnosh,N.
Specialty Rounds. Current concepts in the ectopic production of fetal proteins and hormones by neoplastic cells.
American J. Med. Sci. 275, 232 - 248 (1978)

21. Darnell,S.
MRNA structure and function.
In: Cohn,W., Volkin,E. (Eds.) Progress in nucleic acid research and molecular biology. Academic Press New York San Francisco London 19, 493 - 511 (1976)

22. Dintzis,H.
Assembly of the peptide chains of hemoglobin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 247 -261 (1961)

23. Efstratiadis,A., Kafatos,F. and Maniatis,T.
The primary structure of rabbit ß-globin mRNA as determined from cloned DNA.
Cell 10, 571 - 585 (1977)

24. Gallop,P. and Paz,M.
Posttranslational protein modifications, with special attention to collagen and elastin.
Physiol. Rev. 55, 418 - 487 (1975)

25. Gilbert,W.
Why genes in pieces?
Nature 271, 501 (1978)

26. Groner,B., Hynes,N., Sippel,A., Jeep,S., Huu,M. and Schütz,G.
Immunoadsorption of specific chicken oviduct polysomes.
J. Biol. Chem. 252, 6666 - 6674 (1977)

27. Gurdon,J., Lane,C., Woodland,H. and Marbaix,G.
Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells.
Nature 233, 177 - 182 (1971)

28. Harding,J., Mc Donald,R., Przybyla,A., Chirgwin,J., Pictet,R. and Rutter,W.
Changes in the frequency of specific transcripts during development of the pancreas.
J. Biol. Chem. 252, 7391 - 7397 (1977)

29. Hew,C. and Yip,C.
Biosynthesis of polypeptide hormones.
Canad. J. Biochem. 54, 592 - 599 (1976)

30. Heywood,S., Dowben,R. and Rich,A.
The identification of polyribosomes synthesizing myosin.
Biochemistry 57, 1002 - 1009 (1967)

31. Hunt,T., Hunter,T. and Munro,A.
Control of hemoglobin synthesis: Rate of translation of the messenger RNA for the α and ß chains.
J. Mol. Biol. 43, 123 - 133 (1969)

32. Hunt,T., Vanderhoff,G. and London,I.
Control of globin synthesis: The role of heme.
J. Mol. Biol. 66, 471 - 481 (1972)

33. Innis,M. and Miller,D.
α-fetoprotein gene expression. Control of α-fetoprotein mRNA levels in cultured rat hepatoma cells.
J. Biol. Chem. 254, 9148 - 9154 (1979)

34. Irwin,D., Kumar,A. and Malt,R.
Messenger ribonucleoprotein complexes isolated with oligo(dT)-cellulose chromatography from kidney polysomes.
Cell 4, 157 - 165 (1975)

35. Kabat,D.
Potentiation of hemoglobin messenger ribonucleic acid.
J. Biol. Chem. 250, 6085 - 6092 (1975)

36. Kew,M., Torrance,J., Derman,P., Simon,M., Macnab,G., Charlton,K. and Bothwell,T.
Serum and tumor ferritins in primary liver cancer.
Gut 19, 294 - 299 (1978)

37. Knöchel,W., Patel,N. and Holoubek,V.
Polysomal poly(A)$^+$RNA in liver of rats fed 3-methyl-4dimethyl-aminoazobenzene and in hepatoma induced by the same carcinogen.
Biochim. Biophys. Acta 606, 67 - 75 (1980)

38. Laga,E., Baliga,B. and Munro,H.
Isolation and properties of polysomes from human placenta.
Biochim. Biophys. Acta 213, 391 - 400 (1970)

39. Lamerz,R.
Persönliche Mitteilung (1981)

40. Lewin,B.
Units of transcription and translation: The relationship between heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA.
Cell 4, 11 - 20 (1975)

41. Lingrel,J. and Borsook,H.
A comparison of amino acid incorporation into the hemoglobin and ribosomes of marrow erythroid cells and circulating reticulocytes of severely anemic rabbits.
Biochemistry 2, 309 - 314 (1963)

42. Lingrel,J.
Preparation and assay of hemoglobin mRNA.
In: Methods in Mol. Biology, Vol. 2: Protein Biosynthesis in Nonbacterial Systems (Eds.: Last,J. and Laskin,A.)
231 - 263 (1972)

43. Lodish,H. and Jacobsen,M.
Regulation of hemoglobin synthesis.
J. Biol. Chem. 247, 3622 - 3629 (1972)

44. Mans,R. and Novelli,G.
Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disc method.
Arch. Biochem. Biophys. 94, 48 - 53 (1961)

45. Marcus,A.
Tobacco Mosaic Virus ribonucleic acid-dependent amino acid incorporation in a wheat embryo system in vitro.
J. Biol. Chem. 245, 955 - 961 (1970)

46. Marcus,A., Efron,D. and Weeks,D.
The wheat embryo cell-free system.
Methods in Enzymology, Vol. XXX (Nucleic Acids and Protein Synthesis, Part F) Eds. Moldave,K. and Grossmann,L.,
749 - 754 Academic Press, New York London (1974)

47. Mathews,M. and Korner,A.
Mammalian cell-free protein synthesis directed by viral ribonucleic acid.
Eur. J. Biochem. 17, 328 - 338 (1970)

48. Mc Keehan,W.
Regulation of hemoglobin synthesis.
J. Biol. Chem. 249, 6517 - 6526 (1974)

49. Means,A., Woo,S., Harris,S. and O'Malley,B.
Estrogen induction of ovalbumin mRNA: Evidence for transcription control.
Mol. Cell. Biochem. 7, 33 - 42 (1975)

50. Metafora,S., Felsani,A., Cotrufo,R., Tajana,G., Iorio,G., Del Rio,A., De Prisco,P. and Esposito,V.
Neural control of gene expression in the skeletal muscle fibre: the nature of the lesion in the muscular protein-synthesizing machinery following denervation.
Proc. R. Soc. Lond. B 209, 239 - 255 (1980)

51. Miura,K., Law,S., Nishi,S. and Tamaoki,T.
Isolation of α-fetoprotein messenger RNA from mouse yolc sac.
J. Biol. Chem. 254, 5515 - 5521 (1979)

52. Mondal,H., Sutton,A., Chen,V. and Sarkar,S.
Highly purified mRNA for myosin heavy chain: Size and polyadenylic acid content.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 988 - 996 (1974)

53. Moore,R., Goldsworthy,T. and Pitot,H.
Turnover of 3'-Polyadenylate-containing RNA in livers from Aged, Partially Hepatectomized, Neonatal and Morris 5123 C Hepatoma-bearing Rats.
Cancer Research 40, 1449 - 1457 (1980)

54. Morris,G., Buzash,E., Rourke,A., Teppermann,K., Thompson,W. and Heywood,S.
Myosin messenger RNA: Studies on its purification, properties and translation during myogenesis in culture.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 535 - 541 (1972)

55. Munro,H. and Steinert,P.
The intracellular organisation of protein synthesis.
In: Synthesis of Amino acids and Protein, MTP International Review of Science, Biochemistry Series I.
H.R.V. Amstein (Editor) Vol 7, 359 - 404, Butterworth London (1975)

56. Nicholas,J., Nardacci,N., Jones,J., Hall,A. and Olson,R.
Synthesis of nascent prothrombin and albumin in a heterologous system using rat liver messenger RNA purified on oligo-dT-cellulose.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 51 - 58 (1975)

57. Oertel,J.
Anion exchange chromatography of serum ferritin in patients with malignant diseases.
Tumor-Diagnostik 2, 99 - 103 (1981)

58. Ouelette,A., Kumar,A. and Malt,R.
Physical aspects and cytoplasmic distribution of messenger RNA in mouse kidney.
Biochim. Biophys. Acta 425, 384 - 395 (1976)

59. Palmiter,R.
Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation.
J. Biol. Chem. 248, 2095 - 2106 (1973)

60. Palmiter,R.
Quantitation of parameters that determine the rate of ovalbumin synthesis.
Cell 4, 189 - 197 (1975)

67. Sala-Trepat,J., Dever,J., Sargent,T., Thomas,K., Sell,S. and Bonner,J.
Changes in expression of albumin and α-fetoprotein genes during rat liver development and neoplasia.
Biochemistry 18, 2167 - 2178 (1979)

68. Sarkar,S., Mukherjee,S., Sutton,A., Mondal,H. and Chen,V.
Isolation of messenger ribonucleic acid for myosin heavy chain.
Prep. Biochem. 3, 583 - 604 (1973)

69. Scherrer,K., Spohr,G., Granboulan,N., Morel,C., Grossclaude,J. and Chezzi,C.
Nuclear and cytoplasmic messenger-like RNA and their relation to the active messenger RNA in polyribosomes of HeLa cells.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 539 - 554 (1970)

70. Scherrer,K., Imaizumi-Scherrer,M., Reynaud,C. and Therwath,A.
On pre-messenger RNA and transcriptions a review.
Molec. Biol. Rep. 5, 1 - 2 u. 5 - 28 (1979)

71. Schreiber,G. and Urban,J.
The synthesis and secretion of albumin.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 82, 27 - 89 (1978)

72. Shafritz,D., Drysdale,J. and Isselbacher,K.
Translation of liver messenger ribonucleic acid in a messenger-dependent reticulocyte cell-free system.
J. Biol. Chem. 248, 3220 - 3227 (1973)

61. Pelham,R. and Jackson,R.
An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates.
Eur. J. Biochem. 67, 247 - 256 (1976)

62. Perry,R.
Processing of RNA.
Ann. Rev. of Biochemistry, 605 - 629 (1976)

63. Peters,T.
Intracellular albumin transport.
In: Albumin Structure, Function and Uses (Eds. Rosenoer,V., Oratz,M. and Rothschild,M.) 305 - 332, Pergamon Press, Oxford New York (1977)

64. Przybyla,A. and Strohman,R.
Myosin heavy chain messenger RNA from myogenic cell cultures.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 662 - 666 (1974)

65. Roberts,B. and Paterson,B.
Efficient translation of tabacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9 S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2330 - 2334 (1973)

66. Sala-Trepat,J., Savage,M. and Bonner,J.
Isolation and characterization of poly(adenylic acid)-containing messenger ribonucleic acid from rat liver polysomes.
Biochim. Biophys. Acta 519, 173 - 193 (1978)

73. Shore,G. and Tata,J.
Functions for polyribosome-membrane interactions in protein synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 472, 197 - 236 (1977)

74. Skryten,A., Unsgaard,B., Björklund,B. and Eklund,G.
Serum TPA related to activity in a wide spectrum of cancer conditions.
Tumor-Diagnostik 3, 117 - 120 (1981)

75. Stevens,R. and Williamson,A.
Isolation of messenger RNA coding for mouse heavy-chain immunoglobulin.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 1127 - 1131 (1973)

76. Taylor,J.
The isolation of eukaryotic messenger RNA.
Ann. Rev. Biochem. 48, 681 - 717 (1979)

77. Wall,R., Lippmann,S., Toth,K. and Fedoroff,N.
A general method for the large-scale isolation of polysomes and messenger RNA applied to MOPC 21 mouse myeloma tumors.
Analyt. Biochem. 82, 115 - 129 (1977)

78. Watson,J. and Crick,F.
Molecular structure of nucleic acids.
Nature 171, 737 - 738 (1953)

79. Zähringer,J., Baliga,B. and Munro,H.
Subcellular distribution of total Poly(A)-containing RNA and ferritin-mRNA in the cytoplasm of rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1088 - 1093 (1976)

80. Zähringer,J., Baliga,B. and Munro,H.
Novel mechanism for translational control in the regulation of ferritin synthesis by iron.
Nat. Acad. Sci. USA 73, 857 - 861 (1976)

81. Zähringer,J., Baliga,B. and Munro,H.
Increased levels of microsomal albumin-mRNA in the liver of nephrotic rats.
FEBS Letters 62, 322 - 325 (1976)

82. Zähringer,J., Baliga,B., Crim,M. and Munro,H.
Hepatic synthesis of export proteins.
In: Albumin Structure, Function and Uses (Eds. Rosenoer,V., Oratz,M. and Rothschild,M.) 203 - 225, Pergamon Press, Oxford New York Toronto (1977)

83. Zähringer,J.
Die Regulation der Herzmuskelproteinsynthese.
Klin. Wschr. 57, 541 - 553 (1979)

84. Zähringer,J., Kandolf,R., Raum,W., Troesch,G., Stäb,G. and Jäger,E.
Isolation and characterization of structurally and functionally intact polyribosomes and mRNA from rat heart muscle.
J. Mol. Cell. Cardiology 13, 127 - 146 (1981)

85. Zähringer,J.
Genexpression und Proteinsynthese im normalen Herzmuskel und bei der Adriamycin-Kardiomyopathie.
Habilitationsschrift, I. Med. Klinik, Klinikum Großhadern, Universität München (1981)

86. Zähringer,J. and Klaubert,A.
The effect of triiodothyronine on the cardiac mRNA.
J. Mol. Cell. Cardiology 14, 559 - 571 (1982)

87. Zähringer,J., Pritzl,N. and Stäb,G.
Quantitation of cardiac polysomal mRNA by hybridization to (^{3}H)Poly(U).
J. Mol. Cell. Cardiology 14, 539 - 550 (1982)

7. ANHANG

Abkürzungen:

DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	complementäre DNS
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
PMS	Postmitochondrialer Überstand ("Supernatent")
Poly(A)	Poly(adenylat)
POPOP	2,2'-p-Phenylen-bis(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RNS	Ribonukleinsäure
HnRNS	Heterogene nukleäre RNS
mRNS	Messenger-RNS
rRNS	Ribosomale RNS
tRNS	Transfer-RNS
S	Svedberg
SA	Spezifische Aktivität
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat (Dodecylsulfat Na-Salz)
TES	Trichloressigsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. K. Mann für die Überlassung des Themas und die unermüdliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. J. Zähringer für die Vermittlung methodischer Grundlagen der Molekulargenetik sowie seinen Technischen Assistentinnen G. Stäb, E. Jäger und A. Junk für zahlreiche praktische Anleitungen.

Herrn Prof. Dr. R. Pichlmayr vom Department Chirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich dafür, daß er das Operationspräparat des hepatozellulären Karzinoms für unsere biochemischen Untersuchungen zur Verfügung stellte.

9. LEBENSLAUF

Am 19. November 1957 wurde ich als Sohn des Möbelhändlers Lorenz Gerl und seiner Frau Erika, geb. Forstner, in Bad Reichenhall geboren.

1964 kam ich in die Volksschule Ruhpolding.

1968 trat ich in den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Chiemgau-Gymnasiums Traunstein ein.

1977 bestand ich dort im Mai die Abiturprüfung.

1977 begann ich im Herbst als Stipendiat nach dem Bayrischen Begabtenförderungsgesetz mit dem Studium der Human-Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

1979 bestand ich im August die ärztliche Vorprüfung.

1980 den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung,

1982 den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

1983 trete ich im Oktober zum 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung an.